



**„Untersuchung der Funktion der N-terminalen Verlängerung von
GBP 130 von *Plasmodium falciparum*“**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Luis F. Barniol
aus Guayaquil

Marburg/Lahn 2013

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am
15.02.2013 angenommen.

Erstgutachter: PD Dr. Jude Przyborski

Zweitgutachter: Prof. Dr. Uwe Maier

Tag der mündlichen Prüfung am: 22.02.2013

I Inhaltsverzeichnis

II Abkürzungen **i**

III Abbildungsverzeichnis **iii**

IV Zusammenfassung **v**

1. Einleitung **1**

1.1 Malaria Epidemiologie und Pathologie **1**

1.2 Der Entwicklungszyklus von *Plasmodium falciparum* **2**

1.3 Postinvasive Modifikationen der Wirtszelle **4**

1.4 Der sekretorische Weg **7**

1.5 Signalsequenzen **8**

1.5.1 Rolle der Signalsequenzen in der Proteinbiogenese und Signaltransduktion **9**

1.6 Transport in die PV und über die PVM hinweg **12**

1.7 Glykophorin bindendes Protein 130 **12**

1.8 Transport von *Plasmodium* sekretorischen Proteinen in zellfreien Systemen **15**

2. Ziel dieser Arbeit und Strategie **16**

3. Material und Methoden **16**

3.1 Material **16**

3.1.1 Zubehör **16**

3.1.2 Verbrauchsmaterialien **17**

3.1.3 Chemikalien **18**

3.1.4 Medien, Lösungen und Puffers **20**

3.1.5 Kits **24**

3.1.6 Standards für Molekulargewichte **25**

3.1.7 Enzyme **25**

3.1.8 Antikörper **25**

3.1.9 Oligonukleotide, Plasmide und Templates **26**

3.1.10 Bakterien-, Parasiten- und Humanzellenstamm **28**

3.1.11 Software	28
3.2 Methoden	29
3.2.1 Generierung der Plasmide für Transfektion in <i>P. falciparum</i> und Humanzellen	29
3.2.2 Kultivierung von <i>Plasmodium falciparum</i>	35
3.2.3 Kultivierung von Humanzellen	39
3.2.4 Fluoreszenzmikroskop und Bildbearbeitung	40
4. Ergebnisse	40
4.1 <i>in silico</i> Analyse der vorhergesagten exportierten Proteine nach Art ihrer Signalsequenzen	40
4.2 Untersuchung der Funktion der N-terminalen Verlängerung von GBP 130 in <i>Plasmodium falciparum</i>	42
4.2.1 Die N-terminale Verlängerung von GBP 130 alleine kann keinen Transport des Reporterproteins bewirken und hat keinen spezifischen Effekt auf den Transport von GBP 130	42
4.2.2 Die ersten 47 AS von GBP 130 sind mit dem Export löslicher Proteine mit einer kanonischen Signalsequenz kompatibel	45
4.2.3 Der N-Terminus von GBP 130 kann die kanonische Signalsequenz eines exportierten Membranproteins ersetzen	48
4.2.4 Hinzufügen der N-terminale Verlängerung von GBP 130 oder einer artifiziellen Verlängerung zu der kanonischen Signalsequenz eines exportierten Membranproteins kann den Proteintransport bewirken	50
4.2.5 Der verkürzte N-Terminus von GBP 130 kann den Export eines Membranproteins antreiben	53
4.2.6 Die Signalsequenz von GBP 130 mit und ohne die ersten 47 AS kann die kanonische Signalsequenz eines Apikoplastproteins ersetzen	55
4.3 Untersuchung der Sekretion von <i>Plasmodium</i> Proteinen in Humanzellen	58
4.3.1 GFP alleine wird nicht in den sekretorischen Weg der Humanzellen aufgenommen	58
4.3.2 Signalsequenz von Exp-1 dirigiert das Reporterprotein in den sekretorischen Weg der Humanzellen	61
4.3.3 Signalsequenz von GBP 130 mit und ohne N-terminale Verlängerung dirigiert das Reporterprotein in den sekretorischen Weg der Humanzellen	63

<u>5. Diskussion</u>	<u>66</u>
5.1 Aussicht	68
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	<u>71</u>
<u>V Danksagung</u>	<u>79</u>
<u>VI Erklärung</u>	<u>79</u>

II Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A-58K	Anti-58K Golgi Protein Antikörper
AS	Aminosäure
ACP	Acyl Carrier Protein
BFA	Brefeldin A
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Exp-1	Exported protein 1
FBS	Fötales Kälberserum
DHFR	Dihydrofolatreduktase
GBP 130	Glykophorin bindendes Protein 130
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
HLA-E	Human histocompatibility leukocyte antigen E
HT Signal	Host targeting signal
IFA	Immunfluoreszenz Assay
KAHRP	Knob associated histidine rich protein
kDa	Kilo Dalton
MC	Maurer's Clefts
MESA	Mature parasite infected surface antigen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
PEXEL	<i>Plasmodium</i> export element

Pf	<i>Plasmodium falciparum</i>
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1
PPM	Parasit Plasmamembran
PrP	Prion Protein
PTEX	<i>Plasmodium</i> translocon of exported proteins
PV	Parasitophore Vakuole
PVM	Parasitophore Vakuolemembran
RESA	Ring infected erythrocyte surface antigen
SBP1	Skeleton-Binding Protein1
SERP	Serine rich protein
SRP	Signal recognition particle
SR	SRP Rezeptor
TM	Transmembrandomäne
TP	Transitpeptid
TVN	Tubovesikuläres Netzwerk

III Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Lebenszyklus von <i>Plasmodium falciparum</i> in der Anopheles Mücke und im Menschen	3
Abb. 2: Struktur eines mit <i>P. falciparum</i> infizierten Erythrozyten	6
Abb. 3: dreiteilige Struktur der Signalsequenz	9
Abb. 4: Merkmale der Signalsequenz von GBP 130	14
Abb. 5: Verteilung der vorhergesagten exportierten Proteine nach Art ihrer Signalsequenzen	41
Abb. 6: Die ersten 47 AS von GBP 130 alleine vermitteln keinen Export des Reporterproteins	43
Abb. 7: Die AS 1-47 von GBP 130 können durch beliebige AS ersetzt werden	44
Abb. 8: die ersten 47 AS von GBP 130 sind dem Export eines mit einer kanonischen Signalsequenz löslichen Proteins kompatibel	46
Abb. 9: auch andere 47 AS sind dem Export eines mit einer kanonischen Signalsequenz löslichen Proteins kompatibel	47
Abb. 10: die komplette verlängerte Signalsequenz von GBP 130 kann den Export von Membranproteinen vermitteln	49
Abb. 11: die ersten 47 AS von GBP 130 haben keinen Einfluss auf die Endbestimmung von Membranproteinen	51
Abb. 12: auch andere artifizielle 47 AS haben keinen Einfluss auf die Endbestimmung von Membranproteinen	52
Abb. 13: auch die h-Region von GBP 130 kann den Export von Membranproteinen vermitteln	54
Abb. 14: die verlängerte Signalsequenz von GB 130 kann die kanonische Signalsequenz eines Apikoplastproteins ersetzen	56

Abb. 15: die h-Region von GBP 130 ist ausreichend um den Transport eines Apikoplastproteins zu steuern	57
Abb. 16: GFP alleine tritt nicht in den sekretorischen Weg der Humanzellen ein	60
Abb. 17: Signalsequenz von Exp-1 tritt in den sekretorischen Weg der Humanzellen ein	62
Abb. 18: Signalsequenz von GBP 130 mit der N-terminalen Verlängerung tritt in den sekretorischen Weg der Humanzellen ein	64
Abb. 19: Signalsequenz von GBP 130 ohne die N-terminale Verlängerung tritt in den sekretorischen Weg der Humanzellen ein	65

IV Zusammenfassung

Plasmodium falciparum exportiert Proteine in den Wirtserythrozyt, die die Wirtszelle morphologisch modifizieren. Eine wichtige Konsequenz dieser morphologischen Veränderung der Wirtszelle ist die Eigenschaft der infizierten Zellen an Rezeptoren im Endothel der Blutgefäße zu binden. Diese adhäsiven Eigenschaften sind verantwortlich für die klinischen Symptome der Malaria Krankheit. Die exportierten Proteine müssen den sekretorischen Weg des Parasiten und die den Parasiten umschließende Parasitophore Vakuole durchqueren, bevor sie das Zytosol oder die Plasmamembran der Wirtszelle erreichen.

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf dem Eintritt von Proteinen in den sekretorischen Weg des Parasiten, dabei insbesondere auf der Erkennung untypisch verlängerter Signalsequenzen. In dieser Arbeit wurde die Funktion der untypischen Signalsequenz des Glykophorin bindenden Proteins 130 (GBP 130) untersucht. Diese Signalsequenz besitzt eine ungewöhnliche N-terminale Verlängerung von 47 Aminosäuren (AS).

Der Effekt dieser N-terminalen Verlängerung von GBP 130 auf die Proteinsortierung in *Plasmodium* wurde im Detail untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Verlängerung keinerlei Einfluss auf die Endbestimmung des Proteins hat und dass die N-terminale Verlängerung kompatibel mit dem Transport löslicher Proteine ist. Zudem wurde gezeigt, dass die verlängerte Signalsequenz von GBP 130 kein für *Plasmodium* spezifisches ER-Erkennungssignal ist, da sie auch vom sekretorischen Weg von Humanzellen erkannt wird.

1. Einleitung

1.1 Malaria Epidemiologie und Pathologie

Malaria ist weltweit eine der gefährlichsten Infektionskrankheiten. Etwa 40 Prozent der Weltbevölkerung lebt in Malariagebieten, in denen schätzungsweise 300 bis 500 Millionen Erkrankungen pro Jahr auftreten und 0.6 Millionen Menschen sterben, die meisten davon sind Kinder (World Health Organization., 2011). Malaria wird durch eine Infektion mit Einzellern (Protozoa) der Gattung *Plasmodium* hervorgerufen. Fünf der fast hundertzwanzig bekannten *Plasmodien* Arten zählen zu den humanpathogenen Erregern der Malaria. *Plasmodium malariae*, als Verursacher der Malaria quartana, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium vivax*, die die Krankheit Malaria tertiana bewirken. Für den Menschen ist die Infektion mit dem Erreger der Malaria tropica, *Plasmodium falciparum*, die gefährlichste Form, welche unbehandelt bei nicht teilimmunen Personen in jedem fünften Fall tödlich verläuft. *Plasmodium knowlesi*, dessen natürlicher Wirt der Javaneraffe ist, wurde vor einigen Jahren als humanpathogen katalogisiert. Diese Form der Malaria befindet sich bevorzugt im Südostasiatischen Raum (Cox-Singh et al., 2008; Cox-Singh and Singh, 2008). *Plasmodium* wird durch weibliche Mücken der Gattung *Anopheles* übertragen, und dementsprechend ist die Verbreitung der Malaria Erreger eng mit dem Lebensraum seines Vektors verbunden, d.h. hauptsächlich in tropischen und subtropischen Gebieten. Jede Malariaerkrankung beginnt mit uncharakteristischen Beschwerden wie Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen, verbunden mit einem allgemeinen Krankheitsgefühl (Weatherall et al., 2002). In der industrialisierten Welt werden Malaria-Erkrankungen daher häufig als grippaler Infekt oder Magen-Darm-Infektion falsch diagnostiziert. Alphonse Laveran (Nobelpreis für Medizin 1907) hat den Malariaerreger zum ersten Mal 1880 in Algerien identifiziert und beschrieben, womit er die bis dahin gängige Meinung Malaria sei eine bakteriell hervorgerufene Krankheit widerlegte. Schließlich entdeckte Ronald Ross (Nobelpreis für Medizin 1902) in Indien 1897 Oozysten im Mitteldarm eines *Anopheles* Moskitos und deckte so den Übertragungsweg der Malaria durch Mücken auf.

1.2 Der Entwicklungszyklus von *Plasmodium falciparum*

Der Malaria auslösende Parasit *Plasmodium* wird von der weiblichen *Anopheles* Mücke übertragen (Abb. 1). Die Infektion des Wirbeltiers erfolgt durch Sporozoiten, die mit dem Speichel der Mücke zu Beginn des Blutsaugens in die Haut gelangen. In Nagetieren wurde gezeigt, dass die Sporozoiten in die Blut- oder Lymphgefäße wandern (Amino et al., 2005) und dort passiv im jeweiligen Strom schwimmen. Schon nach wenigen Minuten verlassen die Sporozoiten die Blutbahn in der Leber und dringen schließlich in sie ein (Frevert, 2004). In Hepatozyten differenzieren sich die Sporozoiten über das Trophozoiten-Stadium zu reifen Leberschizonten. Letztere enthalten etwa 1500 bis 8000 Merozoiten, wobei die Anzahl der Merozoiten pro reifen Schizonten in unterschiedlichen Wirten stark variieren kann (Bachem et al., 1989). Die tausende in den Hepatozyten gebildeten Merozoiten werden in sogenannten Merosomen in die Blutbahn abgegeben (Sturm et al., 2006). Hier treten die Merozoiten aus den Merosomen aus und infizieren Erythrozyten. Wie schon zuvor in der Leberzelle wird bei der Invasion der Erythrozyten eine den Parasiten umschließende Parasitophore Vakuole ausgebildet. In dieser vermehren sich die Parasiten durch Schizogonie abermals. Innerhalb der roten Blutzelle durchläuft der Erreger drei Entwicklungsstadien: das Ring-, das Trophozoiten- und das Schizontenstadium. Das Ringstadium ist durch eine niedrige metabolische Aktivität sowie geringe Veränderungen in der Morphologie und Größe gekennzeichnet (de Rojas and Wasserman, 1985). Für das nachfolgende Trophozoitenstadium sind eine hohe metabolische Aktivität, Zunahme an Größe sowie die Replikation des Genoms charakteristisch. Das Schizontenstadium bereitet den Parasiten auf die Invasion neuer Erythrozyten vor. Durch vielfache Replikation des Genoms und einhergehende Kernteilung bilden sich bis zu 32 neue Merozoiten, die bei der Ruptur der Erythrozyten in den Blutstrom entlassen werden (Cowman and Crabb, 2006). Dieser Vermehrungszyklus wiederholt sich nun ständig. Beim Zerfall der Erythrozyten bleiben Reste der Wirtszelle zurück, die das Immunsystem anregen und so die Fieberanfälle hervorrufen. Einzelne Merozoiten entwickeln sich zu einem späteren Zeitpunkt zu den Geschlechtsformen (Gametozyten), die für die sexuelle Vermehrung im Moskitovektor notwendig sind. Im Gegensatz zu den Schizonten bleiben diese einkernig und zerstören nicht die Membran des Wirtserythrozyten. Die Gametozyten werden beim Stich von der *Anopheles* Mücke aufgenommen und entwickeln sich in ihrem Mitteldarm zu Mikro- und Makrogameten, welche zur diploiden Zygote (Ookinete) verschmelzen (Gametogonie). Dieser durchbohrt die Darmwand, rundet sich ab und wächst an der Außenseite des Darmes zu einem Ookineten heran. Dort bilden sich nach einer Reduktionsteilung mehrere hunderte

Sporozoiten (Sporogonie). Diese werden nach etwa zwei Wochen frei und gelangen über die Hämolymphe in die Speicheldrüsen der Mücke, wobei die Mehrzahl jedoch durch das Immunsystem des Moskito beseitigt wird. Wenn der Speichel beim Stechen in die Haut über den Stechapparat injiziert wird, werden durch ihn Sporozoiten übertragen (Sidjanski and Vanderberg, 1997) und der Zyklus kann von neuem beginnen (Wirth, 2002).

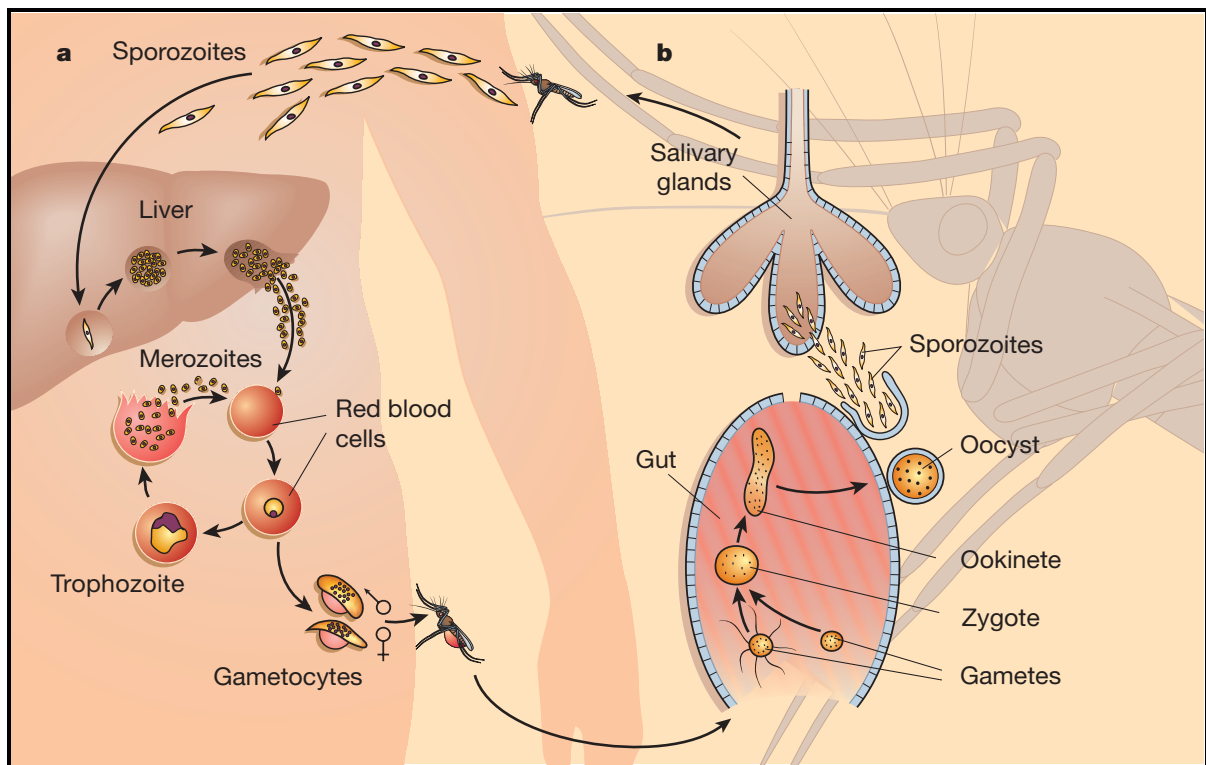


Abb. 1: Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum* in der Anopheles Mücke und im Menschen (Wirth, 2002).

a) Die Sporozoiten gelangen mit dem Speichel der Stechmücke in die Blutbahn. Nach wenigen Minuten erreichen die Parasiten die Leber und vermehren sich durch Schizogonie. Nach einiger Zeit gelangen die Parasiten in die Blutbahn und befallen die Erythrozyten. Einzelne Merozoiten entwickeln sich zu Gametocyten, die für die sexuelle Vermehrung im Moskitovektor notwendig sind b).

1.3 Postinvasive Modifikationen der Wirtszelle

Plasmodium ist außergewöhnlich in der Wahl seiner Wirtszelle. Ausgereifte Erythrozyten sind metabolisch inaktive Zellen, was den Parasiten zwingt, die Wirtszelle zu modifizieren, um eine ausreichende Nährstoffversorgung zu gewährleisten. Diese Modifikationen beginnen bereits während Invasion, indem der Parasit die Wirtszellmembran verändert, um die Parasitophore Vakuole (PV) auszubilden (Cowman and Crabb, 2006; Lingelbach and Joiner, 1998). Die PV ist ein Kompartiment, das den Parasiten vom Zytoplasma der Wirtszelle trennt und in dem der Parasit sich entwickelt (Abb. 2). Bei der Bildung der Parasitophoren Vakuolemembran (PVM) scheinen verschiedene Wirtszellkomponenten inkorporiert zu werden. Dazu zählen unter anderem Sphingolipide, Cholesterin und integrale Membranproteine (Kats et al., 2008). Im Erythrozyten ernährt sich der Parasit von Hämoglobin und währenddessen kriert er innerhalb der Wirtszelle eine komplexe Transport Maschinerie, die es ihm erlaubt, Proteine zu exportieren, die die Wirtszellmembran modifizieren (Cesbron-Delauw et al., 2008; Plattner and Soldati-Favre, 2008). Beispiel für diese Modifikationen sind Erweiterungen an der Membranstruktur der PV, die als Tubovesikuläres Netzwerk (TVN) bezeichnet werden und in das Zytoplasma des Erythrozyten hineinragen (Bannister et al., 2000) (Abb. 2). Es gibt Belege dafür, dass das TVN am Import von Nährstoffen und Lipiden in die Wirtszelle beteiligt ist (Lauer et al., 2000; Lauer et al., 1997). Eine weitere Struktur des infizierten Erythrozyten sind die Maurer's Clefs (MC) bzw. Maurersche Spalten (Abb. 2). Diese Spalten sind im Wirtszellzytoplasma ab dem späten Ringstadium zu finden (Langreth et al., 1978) aber manchmal sind sie im früherem Ringstadium zu erkennen (Grüning et al., 2011). Eine Vielzahl von parasitenkodierten integralen Membranproteinen sind in der Membran der MC verankert (Bullen et al., 2012; Przyborski et al., 2005; Sargeant et al., 2006; Vincensini et al., 2005). Ein Beispiel dafür ist SBP1 (Skeleton-Binding Protein1) (Blisnick et al., 2000). SBP1 ist essentiell für die Expression von dem Malaria Hauptvirulenz-Antigen auf der Oberfläche des infizierten Erythrozyten, PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1) (Cooke et al., 2006; Maier et al., 2007). PfEMP1 ist auch in den MC lokalisiert. Dies ist ein Hinweis dafür, dass die MC als Proteinsortierungskompartiment innerhalb der Wirtszelle fungieren (Spycher et al., 2006). PfEMP1 ist für die Zytoadhärenz der Erythrozyten an das Endothel der Blutgefäße verantwortlich. Diese Zytoadhärenz ist durch die extrazelluläre Domäne von PfEMP1 vermittelt. Um der Wirtsimmunabwehr zu entgehen, exprimiert der Parasit in jedem Blutzyklus eine neue PfEMP1 Variante. Die Variabilität bezieht sich auf Aminosäuresequenz der extrazellulären Domäne von PfEMP1, während der zytoplasmatische

Membrananker bei allen Varianten konserviert bleibt (Baruch et al., 1995; Crabb et al., 1997; Smith et al., 1995; Su et al., 1995). Mit Hilfe dieser zytoadhäsiven Eigenschaft der infizierten Erythrozyten entgeht der Parasit der Milzpassage und somit der Entsorgung der mit ihm infizierten Erythrozyten. Die zytoadhäsive Eigenschaft der infizierten Erythrozyten kann letztendlich zu einer Verstopfung der Kapillaren und zu einem Organversagen führen (Haldar and Mohandas, 2007; Miller et al., 2002). PfEMP1 befindet sich in sind elektronendichte Strukturen an der Oberfläche der infizierten Wirtszelle, die sogenannten Knobs (Abb. 2). Diese Strukturen bestehen vorwiegend aus dem parasitenkodierten Protein KAHRP (knob associated histidine rich protein), welches an der Erythrozytenmembran assembliert und mit verschiedenen Komponenten des Zytoskeletts, wie z.B. Spektrin und Aktin interagiert (Pologe and Ravetch, 1986; Rug et al., 2006). Cryoelektron Tomographie Analysen haben gezeigt, dass der Parasit das Wirtszelle Aktin umstrukturiert, um eine Verbindung zwischen MC und Knobs herzustellen, was den Vesikeltransport von den MC zu der Erythrozytenmembran unterstützen kann (Cyrklaff et al., 2011).

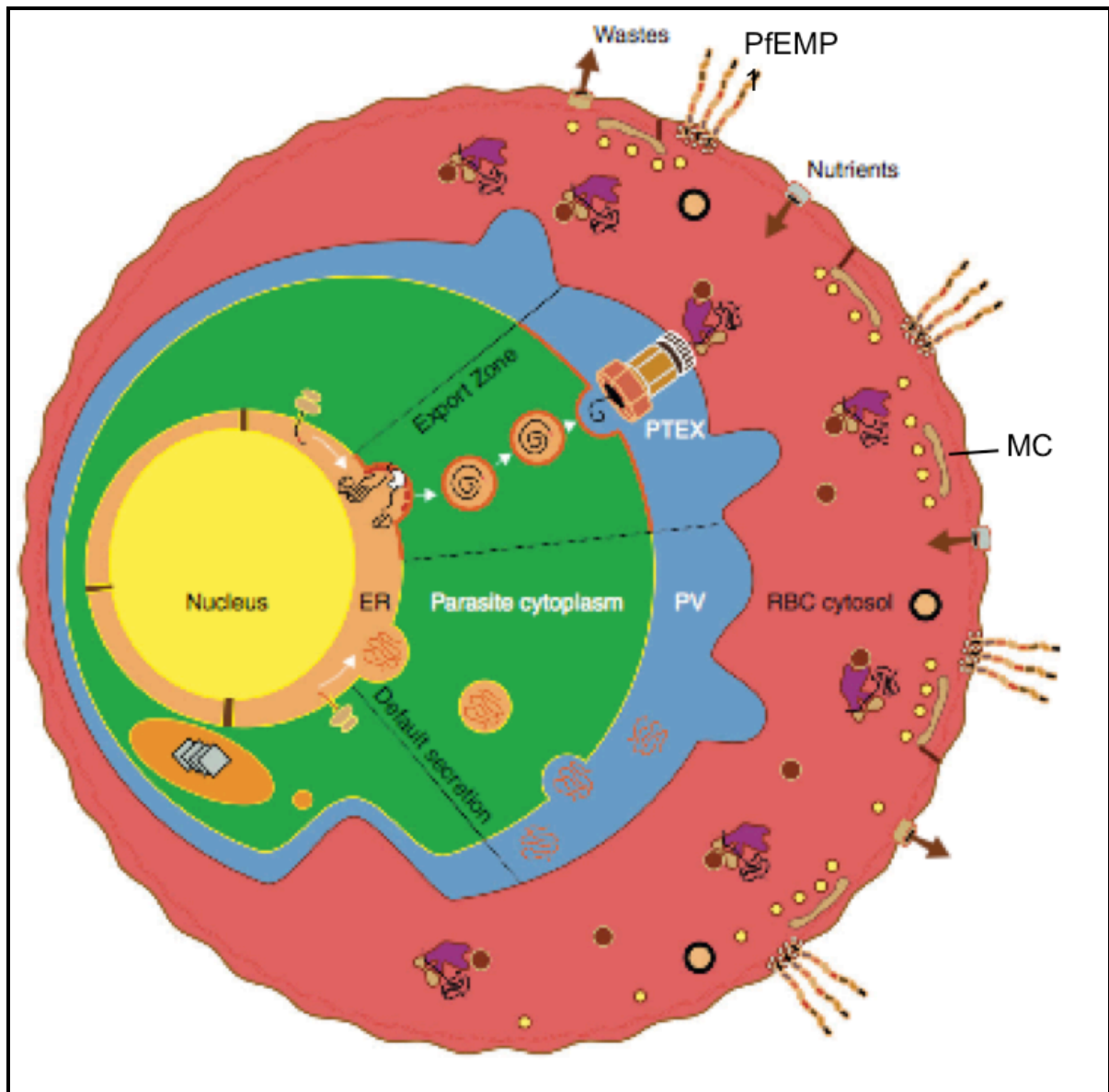


Abb. 2: Struktur eines mit *P. falciparum* infizierten Erythrozyten. Der Parasit (mit seinem Kern in gelb, Endoplasmatisches Retikulum (ER) in orange und Zytoplasma in grün) ist von der Parasitophoren Vakuole (blau) umgeben und exportiert Proteine in das Wirtszellzytoplasma (rot). PfEMP1 wird an die Plasmamembran der Wirtszelle exportiert und sitzt auf den sogenannten Knobs. Proteintransport verursacht strukturelle Modifikationen in der Wirtszelle, wie z.B. die Maurer's Clefts (MC). Exportierte Proteine werden durch den PTEX Translokator in die Wirtszelle transportiert. Sekretorische Proteine ohne Bestimmungsort werden in das Lumen der PV sezerniert (siehe nächsten Abschnitt). Modifiziert nach (Bullen et al., 2012).

Wie in diesem Kapitel erläutert wurde, sind die morphologischen Veränderungen der Wirtszelle und somit die Pathologie von Malaria, Folgen des Transports von parasitenkodierten Proteinen. Dieser Transport stellt eine Herausforderung für den Parasiten dar. Proteine müssen erstens den sekretorischen Weg innerhalb des Parasiten durchlaufen, um später gezielt in die PV zu gelangen und teilweise über die PVM hinaus in die Wirtszelle transportiert zu werden (Abb. 2).

1.4 Der sekretorische Weg

Der sekretorische Weg ist üblicherweise der Weg, den Protein gehen, die entweder aus der Zelle sezerniert werden, oder ihren Bestimmungsort in einem bestimmten Zellkompartiment haben. Der sekretorische Weg wird üblicherweise mit der co-translationalen Insertion in das Endoplasmatische Retikulum (ER) eingeleitet, von dort werden die Proteine in Vesikeln sortiert, und gehen über Golgi Apparat zu ihrem Ziel. Die co-translationale ER Sekretion wird durch die weit verbreitete Signalsequenz eingeleitet. Signalsequenzen spielen eine essentielle Rolle beim Transport und bei der Membraninsertion von sekretorischen und Membranproteinen, sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten (Gierasch, 1989; Walter and Johnson, 1994). Signalsequenzen sind N-terminale Verlängerungen, die Polypeptidketten aus dem Zytosol in die Plasmamembran von Bakterien (Schatz and Beckwith, 1990), in die Membran des ER in Eukaryoten (Walter and Johnson, 1994), in die innere Membran der Mitochondria (Stuart and Neupert, 1996) oder in die Thylakoidmembran der Chloroplasten (Robinson et al., 1998) leiten. Die Signalsequenz wird von einem Ribonukleoproteinkomplex, dem Signal Recognition Particle (SRP) erkannt. Der SRP bindet an die Signalsequenz während sie im Laufe der Translation aus dem Ribosom herausgeht (Walter et al., 1981). Die Bindung des SRP mit dem Ribosom verlangsamt oder stoppt sogar vorübergehend die Elongation der Translation der wachsenden Polypeptidkette (Walter and Blobel, 1981), bis der Komplex aus SRP, wachsender Polypeptidkette, Ribosom und mRNA durch die ER Membran diffundiert und mit dem SRP Rezeptor (SR) oder Docking Protein, einem integralen Membranprotein des ER, interagiert (Gilmore et al., 1982; Meyer et al., 1982). Die Bindung zwischen SRP und SR ist GTP abhängig und leitet die Bindung zwischen Ribosom und ER Membran, gefolgt durch die Freisetzung des SRP und SR aus dem Ribosom, die Fortsetzung der Elongation und die Einleitung der Translokation (Connolly and Gilmore, 1986, 1989; Gilmore and Blobel, 1983). Nach GTP Hydrolyse wird SRP von seinem

Rezeptor freigesetzt und kann erneut seine Funktion ausüben (Connolly et al., 1991). Die Translokation der wachsenden Polypeptidkette in das ER Lumen findet an spezifischen Stellen in der ER Membran statt, den so genannten Translokons (Walter and Lingappa, 1986). Die Translokation geschieht außerdem in der Nähe einer spezifischen Gruppe von Membranproteinen und Glykoproteinen (Görlich et al., 1992a; Görlich et al., 1992b; Krieg et al., 1989; Wiedmann et al., 1989). Noch während der Translokation wird die Signalsequenz auf der Innenseite des ER von der membrangebundenen Signalpeptidase geschnitten bevor die Translation komplettiert wird (Blobel and Dobberstein, 1975; Gilmore and Blobel, 1985). Zu diesem Zeitpunkt, wenn Proteine keine weitere topogenen Sequenzen besitzen, die sie in bestimmte Zellkompartimente dirigieren, durchlaufen den sekretorischen Weg. Zu diesem Zeitpunkt werden die Proteine in Vesikeln verpackt und durchqueren den Golgi Apparat und werden entweder in das umgebende Medium sezerniert (lösliche Proteine) oder in die Plasmamembran integriert (Membranproteine), in so fern sie keine weitere topogenen Sequenzen besitzen, die sie in bestimmte Zellkompartimente dirigieren. Der sekretorische Weg von *P. falciparum* ist ähnlich wie der von anderen Eukaryoten, jedoch besitzt er „zusätzliche“ Endstationen wie das Lumen der PV, die PVM, das Zytoplasma oder die Plasmamembran des infizierten Erythrozyten (Lingelbach and Przyborski, 2006). Noch dazu, gibt es ein anderes charakteristisches Ziel für *Plasmodium*, der Apikoplast. Dabei handelt es sich um ein rudimentärer nichtphotosynthetischer Plastid des Parasiten, der um mehrere Membranen umgeben ist (McFadden et al., 1996).

1.5 Signalsequenzen

Signalsequenzen sind gewöhnlich N-terminal lokalisiert (Blobel and Dobberstein, 1975), zwischen 20 und 30 Aminosäuren (AS) lang (von Heijne, 1985) und haben eine dreiteilige Struktur (Abb. 3), die aus einer n-Region, h-Region und c-Region besteht (Perlman and Halvorson, 1983; von Heijne, 1984). Die polare n-Region befindet sich am N-terminalen Ende und ist sehr variable in ihrer Länge (von Heijne, 1985). Bei der zentralen h-Region handelt es sich um den hydrophoben Kern der Signalsequenz. Sie ist zwischen acht und zwanzig AS lang (von Heijne, 1985) und bildet vermutlich eine Alpha Helix (Gierasch, 1989). Die c-Region definiert die Spaltungsstelle an der die Signalsequenz abgespalten wird (Blobel and Dobberstein, 1975; von Heijne, 1983). Die c-Region ist nie länger als fünf bis sechs AS (von Heijne, 1985). Das Sequenzmotiv für die Spaltung durch die Signalpeptidase

besteht aus kleinen ungeladenen Aminosäureresten in den Positionen -1 und -3 (von Heijne, 1983). Dabei ist das häufigste Motiv Ala-x-Ala (von Heijne, 1986).

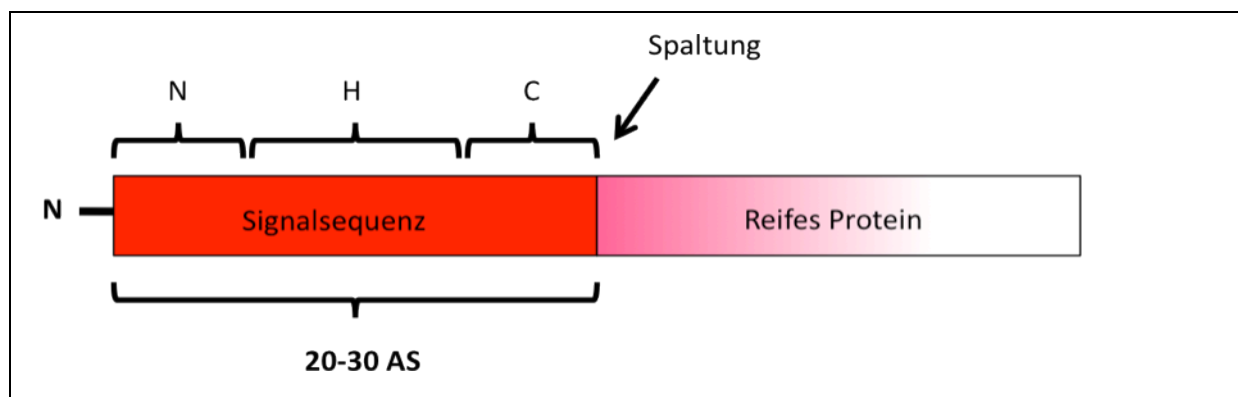


Abb. 3: dreiteilige Struktur der Signalsequenz. Hydrophilische N-terminale Region (N), zentrale hydrophobe Region (H) und C-terminale Region (C) mit der Spaltstelle für die Signalpeptidase (Pfeil). Modifiziert nach (Martoglio and Dobberstein, 1998).

Plasmodium besitzt viele exportierte Proteine, die eine klassische Signalsequenz aufweisen, wie z.B. STEVOR aber auch Proteine, deren Signalsequenzen sich sowohl in ihrer Domänenorganisation als auch in der Länge von den klassischen Signalsequenzen unterscheiden, wie z.B. das Glykophorin bindende Protein 130 (GBP 130) (Sargeant et al., 2006).

1.5.1 Rolle der Signalsequenzen in der Proteinbiogenese und

Signaltransduktion

Anfang der 80er Jahre wurde klar, dass die Signalsequenzen zwischen verschiedenen Proteinen austauschbar sind, dass sie resistent gegen eine große Reihe von Mutationen (Gierasch, 1989; Kaiser et al., 1987) und sogar zwischen verschiedenen Organismen austauschbar sind (Müller et al., 1982; Talmadge et al., 1980). Neue Forschungen haben gezeigt, dass Variationen innerhalb der Signalsequenz Protein-Targeting und -Translokation, sowie die Signalsequenzabspaltung beeinflussen können. Diese Experimente haben vor allem gezeigt, dass die Erkennung und Prozessierung der Signalsequenzen eine essentielle Rolle in der Biogenese der Proteine haben können.

Signalsequenzen können z.B. die Art des Protein Targeting Weges beeinflussen. Hefe und Bakterien SRPs erkennen hauptsächlich sehr hydrophobische Signalsequenzen (de Gier et al., 1998; Lee and Bernstein, 2001; Ng et al., 1996). Proteine deren Signalsequenzen unter dieser Hydrophobizität Schwelle liegen, werden vom SRP umgangen und unterliegen einer post-transnationalen Translokation. In *Escherichia coli* folgt die post-translationale Translokation unter der Regulierung eines Ribosom-assoziierten Chaperons, dem Trigger Faktor. Der Trigger Faktor bindet an das reife Protein und verhindert die Interaktion zwischen Ribosom und dem SecY Komplex (de Gier and Lührink, 2003; Lee and Bernstein, 2002). So werden Proteine schneller exprimiert als bei einer co-translationalen Translokation, was möglicherweise einen Vorteil für schnell wachsende Organismen darstellt.

Variationen innerhalb der Signalsequenz können die Interaktion der Polypeptidkette mit dem Translokon beeinträchtigen. Wenn das Substrat mit dem ER oder mit der zytoplasmatischen Membran in Kontakt kommt, muss es mit einem Translokon interagieren, mit dem Sec61p oder mit dem SecY Komplex (Jungnickel and Rapoport, 1995; Plath et al., 1998). Modifikationen in der Signalsequenz verändern die Lage der Signalsequenz in Relation zu Sec61p (Plath et al., 1998) was zu der Annahme führt, dass die Signalsequenzbindung mit dem Translokon nicht starr ist, sondern dass sie abhängig vom Substrat interagieren kann.

Die Signalpeptide, d.h. die resultierenden Peptide, die nach der Abspaltung der Signalsequenz durch die Signalpeptidase entstehen, können auch eine wichtige Rolle in der Zelle spielen. Der erste klare Beweis dafür, dass die Signalpeptide eine Post-Abspaltung Funktion haben, ist die Beobachtung, dass einige Selbstantigene der Immunzellen von Signalpeptide abstammen. HLA-E (Human histocompatibility leukocyte antigen E) präsentiert ein neun AS langes Peptid auf der Zelloberfläche, das einer konservierten Sequenz von vielen Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse I Proteine entspricht (Borrego et al., 1998; Braud et al., 1997). Die Präsenz der Peptid beladenen HLA-E auf der Zelloberfläche ist ein Indikator für aktive Expression der MHC Klasse I Proteine und fungiert als inhibitorisches Signal für die natürlichen Killerzellen (Borrego et al., 1998; Braud et al., 1998). Die Herunterregulierung der Expression der MHC Klasse I Proteine, die z.B. während einer viralen Infektion stimuliert wird, resultiert in einer Senkung sowohl der HLA-E Präsentation als auch der Zell-Zerstörung durch die natürlichen Killerzellen. Auf dieser Weise werden abgespaltene Signalpeptide als Berichtssystem für den intrazellulären Zustand der Zelle an der Plasmamembran genutzt.

Die am meisten untersuchten verlängerten Signalsequenzen gehören zu den viralen Proteinen. Ein interessanter Fall ist das Signalpeptid von HIV-1 Glykoprotein 160, das an Calmodulin bindet, wenn es in das Zytosol der Zelle freigesetzt wird (Martoglio et al., 1997). Calmodulin ist ein Calcium bindendes Protein, das eine zentrale Rolle bei vielen Signaltransduktionswegen spielt, die von der intrazellulären Calcium Konzentration gesteuert werden (James et al., 1995). Es ist möglich, dass diese Interaktion die Calcium/Calmodulin vermittelte Signaltransduktion innerhalb der Zelle beeinflusst (Martoglio et al., 1997). Die Signalsequenz eines anderen Glykoproteins von HIV (gp120) wird sehr langsam abgespaltet (ca. eine Stunde lang) und bleibt dementsprechend lang im ER (Li et al., 1996). Beim Ersetzen die Signalsequenz von gp120 durch eine andere wird das Glykoprotein schnell an die Zelloberfläche transportiert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Signalsequenz die frühzeitige Exposition von gp120 zum Immunsystem verhindert.

Das Glykoprotein des Lassa Viruses (GP-C) besitzt eine extrem verlängerte Signalsequenz (58 AS). Das unreife Protein wird kotranslational ins ER geleitet, wo es dann in GP-1 und GP-2 proteolytisch prozessiert wird, die die Spikes des Virus bilden. Während die h-Region der Signalsequenz für die Insertion in die ER-Membran verantwortlich ist, spielt die verlängerte Region der Signalsequenz im ER-Lumen eine essentielle Rolle bei der Prozessierung von GP-C (Eichler et al., 2004).

Interleukin-15 hat eine verlängerte Signalsequenz (48 AS), die in zwei Schritten abgespaltet wird. Während die erste Hälfte der Signalsequenz schnell abgespaltet wird, wird die andere Hälfte extrem langsam abgebaut. Es wurde vorgeschlagen, dass die langsame Abspaltung eine zusätzliche Kontrollebene auf die Expression von inflammatorischen Zytokinen bereitstellt (Kurys et al., 2000). Ein anderes Beispiel für eine verlängerte Signalsequenz ist die Signalsequenz des Milchdrüsen Tumor Virus Rem Protein der Maus, die sich nach ihrer Abspaltung in den Nukleoli ansammelt, wo sie möglicherweise eine Rolle als Faktor für den Kernexport übernimmt (Dultz et al., 2008).

Eine andere Funktion der Signalsequenzen ist die Regulierung des Proteinabbaus unter Stressbedingungen. Untersuchungen des Prion Proteins (PrP) der Säugetiere haben gezeigt, dass dessen langes Signalpeptid unter Stress die Insertion ins ER blockiert und somit die Menge an potentiellen missgefalteten Proteinen in ER-Lumen reguliert (Kang et al., 2006).

Alle diese Beispiele zeigen ganz klar, dass hinter den Signalsequenzen, insbesondere ungewöhnlichen Signalsequenzen, viel mehr verborgen ist, als das Leiten der Proteine in den sekretorischen Weg.

1.6 Transport in die PV und über die PVM hinweg

Wenn exportierte Proteine den sekretorischen Weg durchlaufen haben, gelangen sie mittels Vesikeltransport an die Parasit Plasmamembran (PPM). Dort fusionieren die Vesikel mit der PPM und befreien die Proteine in das Lumen der PV (Lingelbach and Przyborski, 2006). Proteine, die in bzw. an der Wirtszelle agieren sollen, werden in einem zweiten Schritt in den Erythrozyten transportiert durch einen Translokator in der PVM, den PTEX (*Plasmodium* Translocator of Exported proteins) (Ansorge et al., 1996; de Koning-Ward et al., 2009; Lingelbach, 1997). Für die Passage der Proteine durch die PVM müssen sie sich in einem ungefalteten Zustand befinden (Gehde et al., 2009). Zuständig für die Translokation von löslichen und Membranproteinen ist ein pentameres Aminosäuremotiv (RxLxE/Q/D), welches als PEXEL (*Plasmodium* export element) oder HT-Signal (host targeting signal) bezeichnet wird (Hiller et al., 2004; Marti et al., 2004). Diese Sequenz wird im ER erkannt und von einer membrangebundenen Peptidase, Plasmepsin V, nach der dritten AS gespalten (Boddey et al., 2010; Russo et al., 2010). So werden exportierte Proteine bereits im ER aussortiert. Obwohl die meisten exportierten Proteine von *Plasmodium* eine PEXEL/HT-Sequenz besitzen (z.B. GBP 130, STEVOR, PfEMP1), gibt es auch welche, die keine PEXEL/HT-Motiv aufweisen und trotzdem in die Wirtszelle exportiert werden (z. B. REX1, SBP1) (Marti et al., 2004; Spielmann and Gilberger, 2010).

1.7 Glykophorin bindendes Protein 130

Das Glykophorin bindende Protein 130 (GBP 130) von *Plasmodium falciparum* ist ein lösliches Protein. Wie sein Name verrät, wurde anfänglich vermutet, dass es an Glykophorin der Erythrozyten Membran bindet und somit die Invasion in die Wirtszelle begünstigt (Perkins, 1984; Ravetch et al., 1985). GBP 130 wird ab dem Trophozoiten Stadium exprimiert, in die PV transportiert (Perkins, 1988) und schließlich in die Wirtszelle exportiert (Bonney and

Mercereau-Puijalon, 1989). Der Transport in die PV ist durch die Signalsequenz von GBP 130 über den sekretorischen Weg vermittelt, und der Export in das Erythrozyten Zytosol wird durch die PEXEL Sequenz vermittelt (Marti et al., 2004). Untersuchungen des Faltungszustandes von GBP 130 während seines Transportes über die PVM haben ergeben, dass die von PEXEL vermittelte Passage löslicher Proteine in das Erythrozyten Zytosol in einem ungefalteten Zustand erfolgt (Gehde et al., 2009). Die Signalsequenz von GBP 130 hat vor ihrer typischen dreiteiligen Struktur eine N-terminale Verlängerung aus 47 AS (Kochan et al., 1986) mit einer bislang unbekannten Funktion. Durch diese N-terminale Verlängerung verschiebt sich die h-Region der Signalsequenz von GBP 130 im Raster der dreiteiligen Struktur (Abb. 4a). Diese Verschiebung oder Zurücksetzung wird anschaulich, wenn die Signalsequenz von GBP 130 durch eine *in silico* Analyse für die Hydrophobizität eines Proteins untersucht wird (Abb. 4b). Dementsprechend werden solche Signalsequenzen als zurückgesetzte Signalsequenzen bezeichnet. Sie werden auch „nichtkanonische“ Signalsequenzen genannt, als Gegenbezeichnung zu typischen, „kanonischen“ Signalsequenzen. Die N-terminale Region von GBP 130 wird von *in silico* Programmen für die Vorhersage von Signalsequenzen, wie SignalP 3.0 (Bendtsen et al., 2004), nicht als ER Signalsequenz erkannt, da diese Algorithmen hydrophobe Sequenzen als wichtigen Teil der Signalsequenz bewerten, die ausschließlich im N-Terminus der untersuchten Proteinsequenz lokalisiert sind. So wird die h-Region im N-Terminus von GBP 130 einfach nicht erkannt, weil sie durch die N-terminale Verlängerung von 47 AS verschoben, zurückgesetzt wurde (Abb. 4c links). Bei Entfernen der N-terminalen Verlängerung von GBP130 und Eingeben die Aminosäuresequenz vorwärts der 47. AS, ergibt SignalP 3.0 eine starke Vorhersage für eine Signalsequenz mit einer Schnittstelle für die Signalpeptidase zwischen AA 65 und 66 (Abb. 4c).

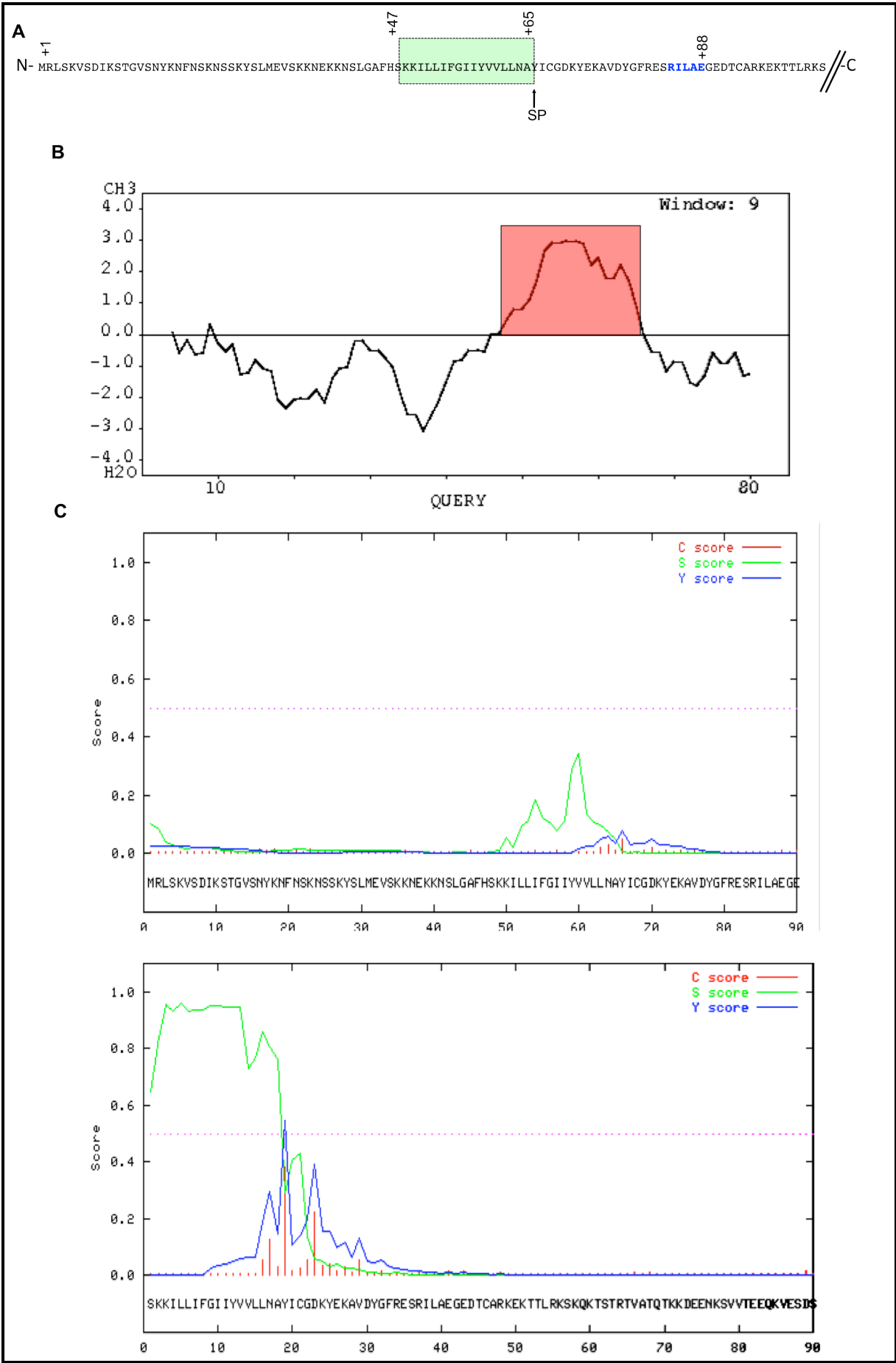


Abb. 4: Merkmale der Signalsequenz von GBP 130. A) schematische Darstellung der Signalsequenz von GBP 130 mit der 47 AS langen n-Region. Grüne Box: hydrophobische Region (AS 48 bis 65) SP: Schnittstelle für die Signalpeptidase (zwischen AS 65 und 66) und blau: PEXEL Sequenz (bis AS 88). B) Hydrophobizitätsblot (Kyte and Doolittle, 1982) zeigt die zurückgesetzte h-Region (rote Box). C) SignalP 3.0 Analyse zeigt keine Vorhersage für eine Signalsequenz für GBP 130 vermittelt durch die 47 AS Verlängerung in der n-Region (oben) aber eine Vorhersage ohne die verlängerte n-Region (unten).

1.8 Transport von *Plasmodium* sekretorischen Proteinen in zellfreien

Systemen

Wie im Abschnitt 1.4 beschrieben wurde, ist die Translokation der wachsenden Polypeptidkette in die ER-Membran der erste Schritt des sekretorischen Weges von Eukaryoten und dieser erste Schritt ist durch die Signalsequenzen vermittelt. *Plasmodium* besitzt, wie alle eukaryotischen Zellen, ein ER. Dieses konnte mit Elektronenmikroskopie und durch die Detektion von ER-spezifischen Enzymen, wie die Signalpeptidase, nachgewiesen werden (Aikawa, 1971; Lingelbach, 1997). Der Golgi Apparat von *Plasmodium* hat keine typische Zisterne Morphologie, wie bei anderen Eukaryoten, sondern eine rudimentäre tubuläre Struktur (Bannister et al., 2000; Elmendorf and Haldar, 1993; Haldar, 1998; Van Wye et al., 1996). Durch die Entdeckung von Rab und GRASP Proteinen konnte die Existenz eines Golgi Apparats in *Plasmodium* bestätigt werden (de Castro et al., 1996; Struck et al., 2005; Struck et al., 2008b; Van Wye et al., 1996).

Frühere Experimente haben gezeigt, dass *Plasmodium* Polypeptide *in vitro* in Weizenkeim oder Kaninchen Retikulozytenlysat zellfreie Systeme translatiert konnten (Günther et al., 1991; Howard and Schmidt, 1995; Ragge et al., 1990).

Besonders gut beschrieben ist die Translation-Translokation von Exp-1 (exported protein 1) und von SERP (serine rich protein) (Günther et al., 1991; Ragge et al., 1990). Beide Proteine besitzen eine kanonische Signalsequenz und konnten in Mikrosomen von Säugetieren translokiert werden.

Auch die Translation-Translokation GBP 130 konnte in zellfreien Systemen beobachtet werden (Lingelbach, persönliche Mitteilung).

Diese Ergebnisse zeigen, dass *Plasmodium* Proteine mit verschiedenen Signalsequenzen auch von einer Translation-Translokation Maschinerie eines anderen Organismus erkannt werden konnten. Untersuchungen der Sekretion von *Plasmodium* Proteinen in Säugetierzellen als Modellsystem konnte allerdings bis jetzt nicht gezeigt werden.

2. Ziel dieser Arbeit und Strategie

Das Hauptziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Funktion der 47 AS N-terminalen Verlängerung von GBP 130 auf die Proteinsortierung in *Plasmodium falciparum*. Dabei wird analysiert, ob die verlängerte Signalsequenz von GBP 130 in der Lage ist, den Transport verschiedener Proteine mit verschiedenen intrazellulären Lokalisierungen einzuleiten.

Zweites Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Sekretion von *Plasmodium* Proteinen mit verschiedenen Signalsequenzen in Humanzellen.

Um diese Fragen zu beantworten, wurden GFP Fusionsproteine generiert und ihre intrazelluläre Lokalisierung wurde dann mittels Fluoreszenz Mikroskopie untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zubehör

Agarose Gel Kammer	Gibco BRL, Neu-Isenburg
Autoclav VX-150 System	Systec GmbH, Wettenberg
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Blotting Apparatur	Phase, Lübeck

CO2 Inkubator C200	Labotec, Göttingen
CO2 Inkubator Water Jacketed	Nuaire, USA
Geldokumentationssystem	Intas
Kühl-Zentrifuge Mikro 22R	Hettich Zentrifugen
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach
PAA Minigelzubehör	BIO-RAD, München
Netzgerät (Power Supply)	BIO-RAD, München
Personal Cycler (PCR Maschine)	Biometra, Göttingen
pH-Meter 766	Calimatic, Mehring
Roller TRM 50	MAGV, Rabenau Londorf
Sicherheitswerkbank Herasafe	Thermo Scientific, Bonn
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Uno-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Vortexer Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Waage P1200	Mettler, Gießen
Waage 1205 MP	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

CO2 Gas tech. Flasche	Praxair, Düsseldorf
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Erlenmeyer Kolben	Kobe, Marburg
Reaktionsröhrchen (15 ml und 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Gene Pulser Cuvette	BIO-RAD, München
Magnetische Säule	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Menzel-Gläser Superfrost	Menzel GmbH, Braunschweig
N2 2.8 Gasflasche	Praxair, Düsseldorf
Nitrocellulose Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
Pasteur Pipetten	BRAND GMBH, Wertheim
PCR Reaktionsgefäße Multiply® Pro	Sarstedt, Nümbrecht

Gefäß 0,5 ml	
PCR Reaktionsgefäße Multiply® Pro	Sarstedt, Nürmbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürmbrecht
Plastik Petri Schalen	Greiner, Frickenhausen
Plastik Pipetten	Sarstedt, Nürmbrecht
Whatman-Paper	Schleicher & Schuell, Dassel

Materiale und Medien für die Zellkultur

AlbuMAX II	Invitrogen, Darmstadt
DMEN	PAA, Cölbe
D-Sorbitol	Invitrogen, Darmstadt
Gelafundin	Roth, Karlsruhe
Giemsa	Merck, Darmstadt
Human Erythrozytenkonzentrat	
A Rh+ und O Rh+	Blutbank Marburg
Hypoxanthin	CC Pro, Oberdorla
Lipofectamin	Invitrogen, Darmstadt
RPMI 1640	Gibco, Darmstadt
RPMI 1640	PAA, Cölbe
WR 99210	Jacobus Pharmaceuticals, Princeton

3.1.3 Chemikalien

Agarose	Eurogentec, Belgien
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Ammonium Peroxo-Sulphat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat (NH ₄) ₂ SO ₄	Roth, Karlsruhe
Brefeldin A (BFA)	Sigma, Taufkirchen
Bromphenol Blau	Amersham Biotech, Freiburg
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulphoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe

Di Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Applichem, Darmstadt
DNA Marker 1 kb+ DNA	Invitrogen, Darmstadt
dNTPs	Peqlab, Erlangen
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol p.a. (EtOH)	Applichem, Darmstadt
Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma, Taufkirchen
Ethylendiamintetra-acetic acid (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethylenglycol-bis-(beta-aminoethylether) (EGTA)	Roth, Karlsruhe
Fluoromount	Biozol, Eching
Glukose	Roth, Karlsruhe
Guanidin Hydrochlorid	Applichem, Darmstadt
Glyzerol	Applichem, Darmstadt
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Hefe Extrakt	Roth, Karlsruhe
Hepes	Applichem, Darmstadt
Hoechst 33258	Molecular probes, Darmstadt
Hydrogenperoxid (H_2O_2)	Merck, Darmstadt
Hydrochinon	Applichem, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kalium Acetat	Applichem, Darmstadt
Kalium Bromid (KBr)	Applichem, Darmstadt
Kalium Chlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck, Darmstadt
Kieselgel 60	Merck, Darmstadt
Kresol Rot	Aldrich, Steinheim
LB-Agar (Lennox)	Roth, Karlsruhe
Ligasepuffer	Invitrogen, Darmstadt
Luminol	Roth, Karlsruhe
Magnesium Chlorid ($MgCl_2$)	Invitrogen, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Metol	Roth, Karlsruhe

Milch Pulver	Roth, Karlsruhe
Mono-Kalium Phosphat	Roth, Karlsruhe
Natrium Carbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natrium Hydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natrium Sulfit	Roth, Karlsruhe
NNN'-N-tetra methylene ethylene diamine (TEMED)	Fluka, Neu-Ulm
Nutrient-broth	Roth, Karlsruhe
p-Coumarsäure	Sigma, Taufkirchen
Pepton/ Trypton	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva, Heidelberg
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Rinderserum Albumin	PAA, Cölbe
Salzsäure (HCl)	Applichem, Darmstadt
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Applichem, Darmstadt
SOB-Medium (Super Optimal Broth)	Roth, Karlsruhe
Sukrose	Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Tris	Applichem, Darmstadt
Triton x-100	Roth, Karlsruhe
Wasser steril: Aqua purificata	Roth, Karlsruhe

3.1.4 Medien, Lösungen und Puffers

Bakterien-Medien

LB (Luria-Bertani)-Agar	35 g/l LB-Agar
Superbroth pH 7,0	35 g/l Pepton
	20 g/l Hefe Extrakt

	5 g/l NaCl
SOC-Medium	20 g/l Pepton
	5 g/l Hefe Extrakt
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	Lösung autoklavieren
	20 mM MgCl ₂ (steril filtriert)
	20 mM Glukose (steril filtriert)
Ampicillin	50 µg/ml (Endkonzentration)

Lösungen für die Elektrophorese von DNA

Agarose	0,8 bis 1,5% Agarose gelöst in 1x TAE
Agarose Gel Puffer (50x TAE)	2 M Tris
	2 M Essigsäure
	50 mM EDTA
Kresol Rot Ladepuffer pH 8,8	36% Sukrose
	0,1 g Kresol Rot
6x DNA Lade Puffer	1% Bromphenol Blau
	30% Glyzerol
	50 mM Tris/HCl pH 8,0
	5 mM EDTA

Lösungen für die Parasiten Kultur und Transfektion

Cytomix Puffer	a) 10 M KOH
	b) 250 mM Hepes/ 20 mM EGTA
	5,96 g Hepes
	0,76 g EGTA

auf 80 ml mit ddH₂O pH auf 7,6
mit 10 mM KOH (~ 1,4 ml) auf
100 ml mit ddH₂O

c) 10 ml 1 M Phosphat Puffer pH 7,6
8,66 ml 1M K₂HPO₄
1,34 ml 1 M KH₂PO₄⁻

Giemsa-Färbe Lösung

1:10 Verdünnung

WR99210 (1 ml)

a) 20 µM WR99210 stock Lösung (1 ml)
8,6 mg WR99210 in 1 ml DMSO

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl pH 8,0
1 mM EDTA pH 8,0

Lösungen für SDS-PAGE, Western Blotting

Ammonium Peroxodisulphat (APS)

10% APS in ddH₂O

Milchlösung

5% Milch Pulver in PBS pH 7,4

Entwickler D- 19b

0,22% Metol
0,88% Hydroquinon
7,2% Natrium Sulphit
4,8% Natrium Carbonat
0,4% Kalium Bromid

Enhanced Chemiluminescence Lösung

50 mM Luminol in DMSO
0,8 mM p-Coumarsäure in DMSO
200 mM Tris/HCl pH 8,8
0,01% H₂O₂

Phosphate Buffered Saline, pH 7,4 (PBS)

140 mM NaCl
2,7 mM KCl

	1,5 mM KH_2PO_4
	8,3 mM K_2HPO_4
Ponceau Rot S Färbelösung	0,2% Ponceau S
	3% Trichloressigsäure
SDS-PAGE:	
Lauf Puffer	124 mM Tris
	960 mM Glyzin
	0,05% SDS
Proben Puffer (2x)	50 mM Tris/HCL pH 6,8
	2% SDS
	0,1% Bromphenol blau
	10% Glyzerin
	100 mM DTT
4x Sammelgelpuffer Tris-HCL	500 mM Tris/HCl pH 6,8
	0,4% SDS
4x Trenngelpuffer Tris-HCL	1,49 M Tris/HCl pH 8,8
	0,4% SDS
Transfer Puffer (10x)	480 mM Tris/HCl pH 9,5
	390 mM Glyzin
	0,375% SDS
	1x: +20% Methanol
Klonierung:	
Taq Puffer (10x):	200mM Tris/HCl pH 8,8
	100mM KCl
	100mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
	1% Triton x-100

6x Sukrose mit Kresol Rot für Colony Mix:

Etwas Kresol Rot in 10 ml ddH₂O lösen und 6 g Sukrose in dem Überstand davon lösen.

Colony Mix:

600 µl Taq Puffer
 1000 µl Sukrose (6x) mit Kresol Rot
 300 µl dNTP's (2mM)
 4100 µl H₂O

Immunfluoreszenz Assay (IFA)**Blockierlösung**

3% BSA in PBS pH 7,4
 (für *Plasmodium* und Humanzellen)

Fixierungspuffer

4% Paraformaldehyd (PFA)
 0,0075% Glutaraldehyd in PBS
 pH 7,4 (für *Plasmodium*)
 4% PFA in PBS pH 7,4
 (für Humanzellen)

Permeabilisierungspuffer

0,1% Triton X-100 in PBS pH 7,4
 (für *Plasmodium*)
 0,5% Triton X-100 in PBS pH 7,4
 (für Humanzellen)

Quench Puffer

125 mM Glycin in PBS pH 7,4
 (für *Plasmodium*)

3.1.5 Kits

Gelextraktion

Seqlab, Göttingen

Miniprep Plasmid	Seqlab, Göttingen
Maxiprep Plasmid	Qiagen, Hilden
PCR Aufreinigung	Seqlab, Göttingen

3.1.6 Standards für Molekulargewichte

DNA Marker 1 kb+ DNA	Invitrogen, Darmstadt
Protein Marker prestained	Thermo Scientific, Bonn
Protein Marker unstained	Thermo Scientific, Bonn

3.1.7 Enzyme

DNase	Applichem, Darmstadt
KOD DNA Polymerase	Novagen, Darmstadt
Protease Inhibitor Kocktail (PIC)	Calbiochem, Darmstadt
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, USA
T4 DNA Ligase	Invitrogen, Darmstadt
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs, USA

3.1.8 Antikörper

Erst-Antikörper

Huhn α -GFP polyklonal	Jackson Immuno Research, USA
Kaninchen α -ACP polyklonal	G. Mc Fadden

Mouse α -58K Golgi Protein monoklonal	Abcam, England
Mouse α -GFP monoklonal	Roche, Mannheim
Mouse α -PfSBP1 (BR5)	C. Braun-Breton

Zweit-Antikörper

Kaninchen α -Mouse Cy3	Jackson Immuno Research, USA
Kaninchen α -Mouse HRP	DAKO, Dänemark
Ziege α -Huhn Cy2	Jackson Immuno Research, USA
Ziege α -Kaninchen Cy3	Jackson Immuno Research, USA

3.1.9 Oligonukleotide, Plasmide und Templates

Oligonukleotide (Primer)

Name	Sequenz (5'-3')
GBP- <i>XhoI</i> -F	GGCTCGAGATGCGACTTTCTAAAGTATCTG
GBP47- <i>A</i> -Rev	GGCCTAGGATGGAAGGCACCTAAGG
GBP+48- <i>AvrII</i> -F	GGCCTAGGATGTCCAAA AAAATTTTAT
GBP+150- <i>KpnI</i> -R	CCGGTACCTTGCTTTTTTACTACTTTTTTGG
GST-X-F	GGCTCGAGATGTCCCCTATACTAGGTATTG
GST+47- <i>Avr</i> -R	GGCCTAGGTTCAAACCTTTTT GTTTCGCC
STEV-FL- <i>AvrII</i> -F	GGCCTAGGATGAAGATGTATAACCTTAAAATG
STEV+80- <i>KpnI</i> -R	GGGGTACCTTTCTTTATTGCGTCTTCGTTC
GBP_STEV+26_SEW _R	AGCATTCAATAGGACTACCCTTATGTTATAATGGTTATTTT GATA
GBP_STEV+26_SEW _F	GTAGTCCTATTGAATGCTTATCAAATAACCATTATAACA TAAGG

STEVOR-FL- <i>KpnI</i> -R	CCGGTACCTTTCCACGAATTTTTCTTCTCC
GBP+48- <i>X</i> -F	GGCTCGAGATGTCCAAAAAATTTTAT
GBP_ACP_SEW_R	CACTCCATCTTTTTGTGTATTTTAAAAGCATTCAATAGGA CTAC
GBP_ACP_SEW_F	GTAGTCCTATTGAATGCTTTTAAAAATACACAAAAAGATG GAGTG
ACP_TP_K_R	CCGGTACCTTTTAAAGAGCTAGATGGG
GBP- <i>Bg</i> -F	CCAGATCTAAAATGCGACTTTCTAAAGTATCTG
GBP+48- <i>Bg</i> -F	GGAGATCTATGTCCAAAAAATTTTAT
GBP83- <i>Kpn</i> -R	GGGGTACCGCTTTCTCTAAAACCATAATCTACAG
Exp1-ATG- <i>B</i> -F	CCAGATCTAAAATGAAAATCTTATCAGTATTTTTTC
Exp1+35-K-R	CCGGTACCAAGCTGCTAACACCACTTCCAGTTCC

Plasmide

pARL2 GFP (Przyborski et al., 2005)

pEGFP-N1 Clontech, USA

Templates

Für PfGBP 130 abgeleitete codierende Sequenz: PfGBP¹⁻¹⁵⁰ (Gehde et al., 2009)

For PfSTEVOR abgeleitete codierende Sequenz: PfSTEVOR¹⁻²⁹⁶ (Przyborski et al., 2005).

Für PfACP^{TP}: PfACP DsRed (Sato and Wilson, 2004)

Für GST abgeleitete codierende Sequenz: PGEX GST (Amersham)

Für PfExp-1 abgeleitete codierende Sequenz: PfExp-1¹⁻³⁵ (AG Lingelbach)

3.1.10 Bakterien-, Parasiten- und Humanzellenstamm

<i>E. coli</i> TOP 10	Invitrogen, Darmstadt
Huh 7 Humanzellen	Prof. W. Garten
<i>P. falciparum</i> Klon 3D7	diese Arbeitsgruppe
	Klon stammt ursprünglich aus dem NF54 Stamm (Walliker et al., 1987)

3.1.11 Software

4 peaks	www.mekentosj.com
BLAST	blast.ncbi.nlm.nih.gov
ClustalW	www.ch.embnet.org
EnzymeX	www.mekentosj.com
ImageJ64	sb.info.nih.gov
OligoCalc	www. basic.northwestern.edu
PlasmoDB	www.plasmodb.org
Powerpoint	Microsoft

3.2 Methoden

3.2.1 Generierung der Plasmide für Transfektion in *P. falciparum* und

Humanzellen

PCR Ansatz:

	1x
Puffer (10x)	5 µl
Wasser	33 µl
KOD DNA Polymerase	1 µl
Template	1 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
dNTPs	5 µl
MgSO₄	3 µl
Endvolumen	50 µl

Bei einem Overlapping Extension PCR werden zwei PCR Reaktionen durchgeführt. In der erste Reaktion werden zwei Inserts in zwei separate PCR Reaktionen mit dem selben Ansatz (PCR I, wie oben beschrieben) gemacht. Die Produkte vom PCR I werden dann für die zweite PCR Reaktion (PCR II) benutzt.

PCR II Ansatz:

	1x
Puffer (10x)	5 µl
Wasser	3 µl
KOD DNA Polymerase	1 µl
Produkt von PCR I	1 µl
Produkt von PCR II	1 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
dNTPs	5 µl
MgSO₄	3 µl
Endvolumen	50 µl

PCR Programm:

Phase	Temperatur [°C]	Zeit [s]	
Initiale Denaturierung	95	120	
Denaturierung	95	20	50x
Annealing	50	10	
Elongation	70	15	
Abschließende Elongation	68	600	
Aufbewahrung	4	-----	

Dieses PCR Programm wurde bei allen PCRs verwendet. Bei unspezifischen Ergebnissen wurde die Annealing Temperatur bis auf 60°C erhöht.

3.2.1.1 Plasmide für Transfektion in *P. falciparum*

Die Inserts der Plasmide für die Transfektion in *P. falciparum* wurden nach dem folgenden Schema amplifiziert:

Insert/ Produkt1 Produkt2	Primer forward	Primer reverse	Primer forward Overlapping PCR	Primer reverse Overlapping PCR
GBP 1-65 ACP TP GFP				
GBP 1-65	GBP- <i>XhoI</i> -F	GBP_ACP_SEW_R	GBP- <i>XhoI</i> -F	ACP_TP-K_R
ACP TP	GBP_ACP_SEW_F	ACP_TP_K_R		
GBP 48-65 ACP TP GFP				
GBP 48-65	GBP+48- <i>X</i> -F	GBP_ACP_SEW_R	GBP+48- <i>X</i> -F	ACP_TP-K_R
ACP TP	GBP_ACP_SEW_F	ACP_TP_K_R		
GBP 1-65 STEVOR +26 GFP				
GBP 1-65	GBP- <i>XhoI</i> -F	GBP_STEV+26_SE W_R	GBP- <i>XhoI</i> -F	STEVOR-FL- <i>KpnI</i> -R
STEVOR+26	GBP_STEV+26_SE W_F	STEVOR-FL- <i>KpnI</i> -R		
GBP 48-65 STEVOR +26 GFP				
GBP 48-65	GBP+48- <i>X</i> -F	GBP_STEV+26_SE W_R	GBP+48- <i>X</i> -F	STEVOR-FL- <i>KpnI</i> -R
STEVOR +26	GBP_STEV+26_SE W_F	STEVOR-FL- <i>KpnI</i> -R		
GBP 1-47 GFP				
GBP 1-47	GBP- <i>XhoI</i> -F	GBP47- <i>A</i> -Rev		
GBP 1-47 STEVOR 1-80 GFP				
GBP 1-47	GBP- <i>XhoI</i> -F	GBP47- <i>A</i> -Rev		
STEVOR 1-	STEV-FL <i>AvrII</i> -F	STEV+80_ <i>KpnI</i> _R		

80				
GST 47 AA STEVOR 1-80 GFP				
GST 47 AA	GST- <i>X</i> -F	GST+47_ <i>Avr</i> _R		
STEVOR 1-80	STEV-FL <i>AvrII</i> -F	STEV+80_ <i>KpnI</i> _R		
GBP 1-47 STEVOR FL GFP				
GBP 1-47	GBP- <i>XhoI</i> -F	GBP47- <i>A</i> -Rev		
STEVOR FL	STEV-FL <i>AvrII</i> -F	STEVOR-FL- <i>KpnI</i> -R		
GST 47 AA STEVOR FL GFP				
GST 47 AA	GST- <i>X</i> -F	GST+47_ <i>Avr</i> _R		
STEVOR FL	STEV-FL <i>AvrII</i> -F	STEVOR-FL- <i>KpnI</i> -R		
GST 47 AA GBP 48-150 GFP				
GST 47 AA	GST- <i>X</i> -F	GST+47_ <i>Avr</i> _R		
GBP 48-150	GBP+48_ <i>AvrII</i> _F	GBP+150_ <i>KpnI</i> _R		

Die Inserts, die mittels Overlapping Extension PCR amplifiziert wurden, wurden mit *XhoI/KpnI* verdaut und in den äquivalent verdauten pARL2-GFP Vektor (Przyborski et al., 2005) kloniert.

Bei den restlichen Inserts wurde das PCR Produkt 1 mit *XhoI/AvrII* verdaut und in den *XhoI/AvrII* verdauten pARL2-GFP Vektor kloniert. PCR Produkt 2 wurde über die *AvrII/KpnI* Restriktionsschnittstellen in den PCR Produkt 1 enthaltenden pARL2-GFP kloniert.

3.2.1.2 Plasmide für Transfektion in Humanzellen

Die Inserts der Plasmide für die Transfektion in Humanzellen wurden nach dem folgenden Schema amplifiziert:

Insert	Primer forward	Primer reverse
GBP 1-83 GFP		
GBP 1-83	GBP- <i>Bg</i> -F	GBP83- <i>Kpn</i> -R
GBP 48-83 GFP		
GBP 48-83	GBP+48- <i>Bg</i> -F	GBP83- <i>Kpn</i> -R

Exp-1 1-35 GFP		
Exp-1 1-35	Exp1-ATG-B-F	Exp1+35-K-R

Die Inserts wurden mit *BglII/KpnI* verdaut und in den äquivalent verdauten pEGFP-N1 Vektor (Clontech) kloniert.

3.2.1.3 Restriktionsverdau, Ligation und Transformation von *E. coli*

TOP 10 Zellen

Ansatz für den Restriktionsverdau der PCR Produkte:

	1x
PCR Produkt	5 µl
Enzym 1	0,5 µl
Enzym 2	0,5 µl
Puffer (10x)	2 µl
BSA (10x)	2 µl
Wasser	10 µl
Endvolumen	20 µl

Der Verdau wurde bei 37°C für 1 Stunde durch geführt.

Ansatz für den Restriktionsverdau den Vektor:

	1x
Vektor	4 µl
Enzym 1	1,5 µl
Enzym 2	1,5 µl

Puffer (10x)	3 μ l
BSA (10x)	3 μ l
Wasser	17 μ l
Endvolumen	30 μ l

Der Verdau wurde bei 37°C für 6 Stunden durch geführt.

PCR Produkte und Vektoren wurden mit den jeweiligen Aufreinigungskits aufgereinigt und mit der T4 DNA Ligase bei 16°C über Nacht ligiert. Der Ligationsansatz wurde am nächsten Tag mit Ethanol präzipitiert und in die elektrokompetente *E. coli* TOP 10 eingeführt. Am Tag danach wurden die daraus entstandenen Kolonien mittels Kolonie PCR untersucht. Dabei wurde ein PCR mit jeder einzelnen Kolonie als Template durchgeführt um positive Klone zu isolieren. In dem Ansatz bindet einer der Primer an den Vektor und der andere bindet der an das Insert.

PCR Ansatz:

	1x
Kolonie Mix	23,5 μ l
Primer forward	0,5 μ l
Primer reverse	0,5 μ l
Taq DNA Polymerase	0,5 μ l

PCR Programm:

Phase	Temperatur [°C]	Zeit [s]	
Initiale Denaturierung	95	180	
Denaturierung	94	30	

Annealing	50	30	25x
Elongation	72	60	
Abschließende Elongation	72	300	
Aufbewahrung	4	-----	

Positive Klone wurde dann vermehrt und die Plasmide wurden mittels Miniprep Plasmid Kit isoliert. Die Plasmide wurden mittels Restriktionsverdau überprüft und dann bei den Firmen Seqlab oder GATC sequenziert.

3.2.2 Kultivierung von *Plasmodium falciparum*

3.2.2.1 Kultivierung der *P. falciparum* Blut Stadien

Die Kultivierung von *Plasmodium falciparum* (Stamm 3D7, asexuelles intraerythrozytäres Stadium) erfolgte in RPMI mit humanen A⁺ Erythrozyten. Die Parasitämie wurde regelmäßig mit Ausstrichen von mit Giemsa gefärbten Parasiten bestimmt. Bei Erreichen einer Parasitämie von maximal 10 % wurde sie reduziert, indem ein Teil der infizierten Erythrozyten durch nicht infizierte Erythrozyten ersetzt wurde. Es erfolgte ein regelmäßiger Wechsel des Mediums. Um ideale Bedingungen zu schaffen, wurde die Parasiten Kultur mit einem Gemisch aus 5% CO₂, 5% O₂ und 90% N₂ begast und in einem 37°C Inkubator aufbewahrt (Trager and Jensen, 1976).

3.2.2.2 Bestimmung der Parasitämie mittels Giemsa Färbung

Um die Entwicklungsstadien zu bestimmen und die Parasitämie auszählen zu können, wurden die Parasiten mit Giemsa gefärbt. Dafür wurden Blutausstriche hergestellt, indem 4-6 µl Blut dem Boden der Kultur Flasche entnommen und auf einem Objektträger ausgestrichen wurden. Der Blutausstrich wurde zunächst an der Luft trocknen gelassen und die Zellen dann in

Methanol fixiert. Dieses wurde ebenfalls an der Luft getrocknet und 10 bis 15 min mit in Wasser gelöstem (1:10) Giemsa bedeckt. Die Analyse des Ausstrichs erfolgte mit einem Lichtmikroskop mit einer 100fachen Vergrößerung. Zur Bestimmung der Parasitämie wurden verschiedene optischer Felder ausgezählt und die Parasitämie durch das Verhältnis zwischen infizierten und nicht infizierten Erythrozyten bestimmt.

3.2.2.3 Synchronisation der *P. falciparum* Kultur durch Selektion der Ring-Stadien mit Sorbitol

Die *P. falciparum* Kultur wurde 2 min bei 3000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in einem 5fachen Volumen 5% (w/v) Sorbitol resuspendiert und 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation von 2 min bei 3000 g wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und wie zuvor beschrieben in Kultur genommen (Lambros and Vanderberg, 1979).

3.2.2.4 Synchronisation der *P. falciparum* Kultur durch Selektion der Trophozoiten-Stadien mit Gelafundin

Die Selektion der Parasiten im Trophozoiten Stadium erfolgte mit Gelafundin. Erythrozyten, die mit Trophozoiten infiziert sind weisen sogenannte Knobs in ihrer Membran auf. Diese Knobs erscheinen unter dem Elektronen Mikroskop als Höcker auf der Erythrozyten Membran. Sie enthalten das vom Parasiten in die Wirtszelle sekretierte Protein PfEMP1 (Baruch *et al.* 1995). Da das Protein erst von Parasiten ab dem Trophozoiten-Stadium exprimiert wird, weisen nicht infizierte und mit Ring-Stadien infizierte Erythrozyten diese Knobs nicht auf und unterscheiden sich somit in ihren Sedimentierungseigenschaften von den Stadien mit Knobs. Die *P. falciparum* Kultur wurde 2 min bei 3000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in einem 5fachen Volumen einer Gelafundin Lösung in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach etwa 10 min haben sich zwei Phasen gebildet. Die obere davon enthält die mit Trophozoiten infizierten Erythrozyten, da diese aufgrund der Knobs langsamer absinken als die nicht infizierten und die mit Ring-Stadien infizierten Erythrozyten. Die obere Phase wurde abgenommen und 2 min bei 3000 g zentrifugiert. Von diesen Zellen wurde ein Ausstrich erstellt um durch Bestimmung der

Parasitämie die Effektivität der Selektion zu prüfen und zu entscheiden wie viel von dem Zellpellet in Kultur genommen wird (Pasvol et al., 1978).

3.2.2.5 Transfektion von *P. falciparum* Stamm

Die Transfektionen von *P. falciparum* wurde durch Elektroporation durchgeführt. Es wurden synchronisierte 3D7 Parasiten im Ringstadium mit einer Parasitämie von mindestens 5 bis 10% verwendet. Die Synchronisation erfolgte in der Regel einen Tag vor der Transfektion mit Gelafundin und ansonsten zwei Tage vor der Transfektion mit Sorbitol. Pro Transfektion wurde 80 bis 150 µg Plasmid-DNA verwendet und in 30 µl sterilfiltriertem TE (pH 8,0) gelöst. Dazu wurden 385 µl Cytomix gegeben, wobei darauf geachtet wurde, dass die DNA nicht darin ausfällt. Diesem DNA-Cytomix Gemisch wurden 200 µl der synchronisierten 3D7 Zellen, die zuvor bei 3000 g für 2 min pelletiert wurden, hinzugefügt und in eine 0,2 cm Gene Pulser Küvette überführt. Die Elektroporation wurde mit einer hohen Kapazität (0,310 kV/ 950 µF) durchgeführt. Die sich daraus ergebende Zeitkonstante sollte etwa bei b/n 10 liegen. Direkt nach der Elektroporation wurden die transfizierten Zellen in 12 ml vorgewärmten RPS mit 400 µl O Rh+ Blut resuspendiert und in eine Kultur Flasche überführt und begast. Vier bis sechs Stunden nach der Transfektion wurde die Selektion begonnen. Die Selektion der Parasiten mit episomalen Kopien des Expressionsplasmids wird durch eine Behandlung mit dem Dihydrotriazin WR99210 (WR) sichergestellt (Fidock et al., 1998). Das Antifolat WR wirkt als Droge auf den Parasiten, indem es durch die Membran des Parasiten diffundiert und das endogene DHFR (Dihydrofolatreduktase) von *Plasmodium* hemmt. Da DHFR für den Metabolismus des Parasiten essentiell ist, sind die mit WR behandelten Parasiten nicht in der Lage zu überleben. Unsere Transfektanten jedoch enthalten humanes DHFR (hDHFR) als Selektionsmarker. Die hDHFR wird nicht durch WR gebunden und somit erfolgt keine Beeinträchtigung, so dass es die Funktion der inaktiven PfDHFR übernehmen kann. Auf diese Weise ist gewährleistet, dass ausschließlich die Parasiten überleben, die das Plasmid mit dem Fusionsprotein enthalten. Die nächsten fünf bis sechs Tage nach der Transfektion wurde täglich das Medium gewechselt und 3 µl der 20 µM Selektionsdroge WR hinzugefügt. Sobald auf einem mit Giemsa gefärbten Ausstrich unter dem Licht Mikroskop keine Parasiten mehr zu sehen waren, erfolgte der Medienwechsel und die Zugabe von WR nur noch zwei mal wöchentlich. Jeden zweiten Tag wurde ein Parasiten Ausstrich erstellt und auf lebende Parasiten überprüft. Sobald Parasiten zu finden waren, wurden sie mit Sorbitol auf Ringstadien selektioniert und bei einer Parasitämie von mindestens 2% wurden drei 1 ml Aliquote

erstellt. Diese Aliquote wurden in 1 ml Einfrierlösung resuspendiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und aufbewahrt.

3.2.2.6 Magnetische Trennung der Trophozoiten der Transfektanten über die magnetische Säule und SDS-PAGE Analyse

Um die Transfektanten auf Proteinebene analysieren zu können, wurde ein komplettes Lysat von jedem Transfektant gewonnen, indem die Trophozoiten mit einer magnetischen Säule angereicht wurden. Die mit Trophozoiten infizierten Erythrozyten binden an die Säule, während die nicht infizierten oder mit Ringe infizierten Erythrozyten durch die Säule passieren. Die Bindung der mit Trophozoiten infizierten Erythrozyten an die magnetische Säule wird durch das Hämozoin bewirkt, das eisenhaltige Abbauprodukt des Hämoglobins. Mit dieser Methode bekommt man eine Anreicherung von bis 100%. Die Proteinproben wurden dann 1:1 mit dem 2x Proben Puffer verdünnt und bei 95°C für 8 min denaturiert. Ein Äquivalent von 5×10^6 oder 1×10^7 wurde dann in SDS-PAGE und Immunblot Analyse analysiert. Der Mouse α -GFP monoklonal (1:1000) und der Kaninchen α -Mouse HRP (1:2000) wurden in der Milchlösung verdünnt.

3.2.2.7 Immunfluoreszenz Assay (IFA) von *Plasmodium*

Die Zellen (vorüberwiegend Trophozoiten) wurden mit 4% PFA/0,0075% Glutaraldehyd/PBS fixiert (Tonkin et al., 2006) bei 37°C für 30 min. Danach wurden die Zellen mit 1,25 M Glycin/PBS für 10 min bei Raumtemperatur (RT). Permeabilisierung der Zellen wurden mit 0,1% Triton X-100/PBS für 10 min bei RT durchgeführt. Der Erst-Antikörper wurde über Nacht bei 4°C und der Zweit-Antikörper für 2 Stunden bei RT inkubiert. Bevor die Zellen unter Mikroskop analysiert wurden, wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und in dem letzten Waschschriff wurde Höchst [50 ng/ml] zugegeben um die Kern-DNA der Parasiten zu färben. Die Erst-Antikörper Huhn α -GFP polyklonal (1:1000), Kaninchen α -ACP polyklonal (1:500), Mouse α -PfSBP1 (BR5) (1:100) und die Zweit-Antikörper Ziege α -Huhn Cy2, Ziege α -Kaninchen Cy3, Kaninchen α -Mouse Cy3 (alle 1:2000) wurden in 3% BSA/PBS verdünnt.

3.2.3 Kultivierung von Humanzellen

Die Huh7 Humanzellen wurden in DMEM Medium mit 10% FBS und 5% L-Glutamin mit Penicillin und Streptomycin in einem 5% CO₂ Inkubator bei 37°C kultiviert.

3.2.3.1 Transfektion von Humanzellen und BFA Behandlung

Die Zellen wurden mit unseren Plasmiden mit Lipofectamin transfiziert. Dabei wurde das Protokoll vom Hersteller (Invitrogen) befolgt. Die Transfektion wurde in einer 24 Well-Platte durchgeführt. In jedem Well befand sich ein Deckglas, worauf sich die Zellen anheften konnten. 0,2 bis 0,4 µg DNA und 1 bis 2 µl Lipofectamin wurden benutzt. Die Zellen wurden mit dem Reaktionsansatz in DMEN ohne Serum für 6 Stunden inkubiert. Danach wurde das Medium mit DMEN mit Serum ersetzt. Nach 24 Stunden wurde BFA [1 µg/ml] zu den Zellen zugegeben und nach 4 Stunden wurden die Zellen fixiert und die IFAs durchgeführt.

3.2.3.2 Immunfluoreszenz Assay (IFA) von Humanzellen

Die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen und anschließend mit 4% PFA/PBS für 15 min fixiert. Danach wurden sie mit 0,5% Triton X-100/PBS permeabilisiert. Nach zwei Waschschritten wurde die Zellen mit 3% BSA für 1 Stunde inkubiert. Die Zellen wurden dann 1 Stunde lang mit dem Erst-Antikörper (Mouse α -58K Golgi Protein monoklonal, 1:1000), bei RT inkubiert. Nach andere drei Waschschrritte folgte die Inkubation mit dem Zweit-Antikörper, (Kaninchen α -Mouse Cy3, 1:2000) für 1 Stunde bei RT. Beide Antikörper wurden in der Blockierlösung verdünnt. Danach wurden die Zellen 3x gewaschen und anschließend 10 min mit Höchst/BSA [50 ng/ml] inkubiert, bevor die Zellen unter Mikroskop analysiert wurden. Die Deckgläser wurden dann auf ein Tropfen Fluoromount auf einem Objektträger über Kopf draufgelegt.

3.2.4 Fluoreszenzmikroskop und Bilderbearbeitung

Inverse Fluoreszenzmikroskop Carl Zeiss Axio Observer wurde benutzt um die Live Cell Aufnahmen und die Aufnahmen der fixierten Proben zu machen. Die entstandenen Bilder wurden mit ImageJ64 und Powerpoint bearbeitet. Keine Gamma Anpassungen wurden durchgeführt. Alle Bilder in dieser Arbeit wurden nach den Empfehlungen von (Rossner and Yamada, 2004)) präsentiert.

4. Ergebnisse

4.1 *in silico* Analyse der vorhergesagten exportierten Proteine nach Art ihrer Signalsequenzen

Nach Vorhersagen, exportiert *P. falciparum* über 400 Proteine in das Wirtszellzytosol (Hiller et al., 2004; Marti et al., 2004). Viele dieser exportierten Proteine sind Membranproteine, wie z.B. STEVOR oder PfEMP1, aber eine grosse Anzahl der exportierten Proteine wird löslich in das Zytosol der Wirtszelle exportiert, wie z.B. GBP 130. Interessanterweise, kann eine verlängerte N-terminale Signalsequenz hauptsächlich und vermehrt bei exportierten Proteinen beobachtet werden, die löslich sind, wie im Falle von GBP 130. Im Gegensatz dazu, exportierte Membranproteine weisen hauptsächlich eine kanonische Signalsequenz auf. Dabei stellt sich die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen der Art der Signalsequenz (kanonisch vs nichtkanonisch) und der Art des exportierten Proteins (löslich vs Membrangebunden) besteht.

437 vorhergesagte exportierte Proteine aus dem *Plasmodium* Sequenzdatenbank (Aurrecoechea et al., 2009) wurden in dieser Arbeit auf folgende Merkmale analysiert: 1. Die Präsenz und Art einer N-terminalen hydrophobischen Domäne und 2. Die Anzahl an vorhergesagten Transmembrandomänen (TM). Dabei enthalten 90% aller Proteinen mit einer N-terminalen kanonischen Signalsequenz (n=233) zumindest ein Transmembrandomäne (Abb. 5). Im Gegensatz, 80% aller Proteine mit einer N-terminalen zurückgesetzten (nichtkanonischen) Signalsequenz (n=152) gelten als lösliche Proteine (Abb. 5). Proteine der

PfEMP1 Familie wurden in dieser Analyse nicht berücksichtigt, da sie kein N-terminale hydrophobische Domäne beinhalten (Baruch et al., 1995).

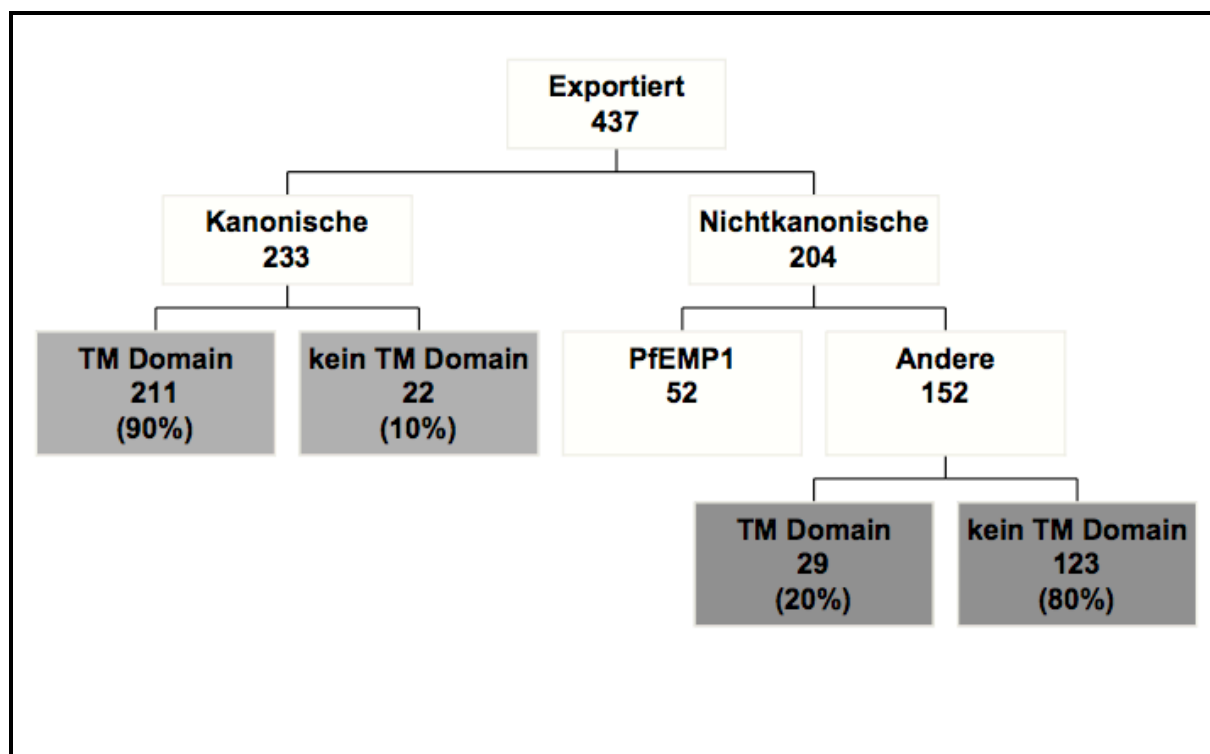


Abb. 5: Verteilung der vorhergesagten exportierten Proteine nach Art ihrer Signalsequenzen. 90% der vorhergesagten exportierten Proteine mit einer kanonischen Signalsequenz sind prognostizierte Membranproteine. Im Gegensatz, 80% der exportierten Proteine mit einer nichtkanonischen Signalsequenz sind als lösliche Proteine prognostiziert. PfEMP1 Proteine wurden nicht berücksichtigt.

Diese Analysen deuten tatsächlich auf eine Verbindung zwischen Art der Signalsequenz und Art des Proteins hin. In den folgenden Experimenten wurde auch auf diese mögliche Verbindung zwischen Art der Signalsequenz und Art des Proteins geachtet.

4.2 Untersuchung der Funktion der N-terminalen Verlängerung von

GBP 130 in *Plasmodium falciparum*

Wie schon im Abschnitt 1.5.1 beschrieben wurde, wird GBP 130 in das Zytosol des Wirtserythrozyten exportiert. Zudem besitzt GBP 130 eine 65 AS lange vorhergesagte Signalsequenz. Die n-Region ist innerhalb der ersten 47 AS enthalten. Die h-Region liegt zwischen AS 47 und 65 und die c-Region mit der Signalpeptidase Schnittstelle zwischen AS 65 und 66 (Abb. 4). In früheren Experimenten wurde gezeigt, dass die ersten 150 AS von GBP 130 ausreichend sind, um GFP in das Zytosol der Wirtszelle zu transportieren (Gehde et al., 2009). Zudem unpublizierte Experimente unserer Arbeitsgruppe haben erwiesen, dass GBP 130 ohne die ersten 47 AS auch in die Wirtszelle exportiert wird (Artikel in Vorbereitung, Corinna Hinrichs MSc Arbeit). Trotz diesem Ergebnis gab es die Überzeugung, dass diese N-terminale Verlängerung eine Funktion ausüben musste, aus dem einfachen Grund, dass die Parasiten diese Verlängerung behalten haben und diese nicht durch selektiven Druck verloren haben. In dieser Arbeit wurde der Effekt des verlängerten N-Terminus der nichtkanonischen Signalsequenz von GBP 130 als ganzes auf den Transport von gut charakterisierten exportierten Proteinen untersucht, die eine kanonische Signalsequenz besitzen. Dabei wurde auch auf das Verhältnis zwischen Art einer Signalsequenz und der Endbestimmung der Proteine geachtet.

4.2.1 Die N-terminale Verlängerung von GBP 130 alleine kann keinen Transport des Reporterproteins bewirken und hat keinen spezifischen Effekt auf den Transport von GBP 130

Als erstes wurde untersucht, ob die N-terminale Verlängerung (die ersten 47 AS) alleine fähig ist, den Transport eines Reporterproteins in das Wirtserythrozyt einzuleiten (Abb. 6A). Dafür wurden transgene Parasiten generiert, die die ersten 47 AS von GBP 130 fusioniert an GFP exprimieren (GBP¹⁻⁴⁷). In der GBP¹⁻⁴⁷ GFP Zelllinie scheint die Fluoreszenz nur innerhalb des Parasiten lokalisiert zu sein (Abb. 6B). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die N-terminale Verlängerung an sich keine Information für den Export von GBP 130 in das Zytosol der Wirtszelle enthält. In Western Blot Analysen mit einem gegen GFP gerichteten Antikörper

(anti-GFP), ist ein Signal der zu erwartenden Größe des GBP¹⁻⁴⁷ GFP Fusionsproteins (32,7 kDa) klar erkennbar (Abb. 6C).

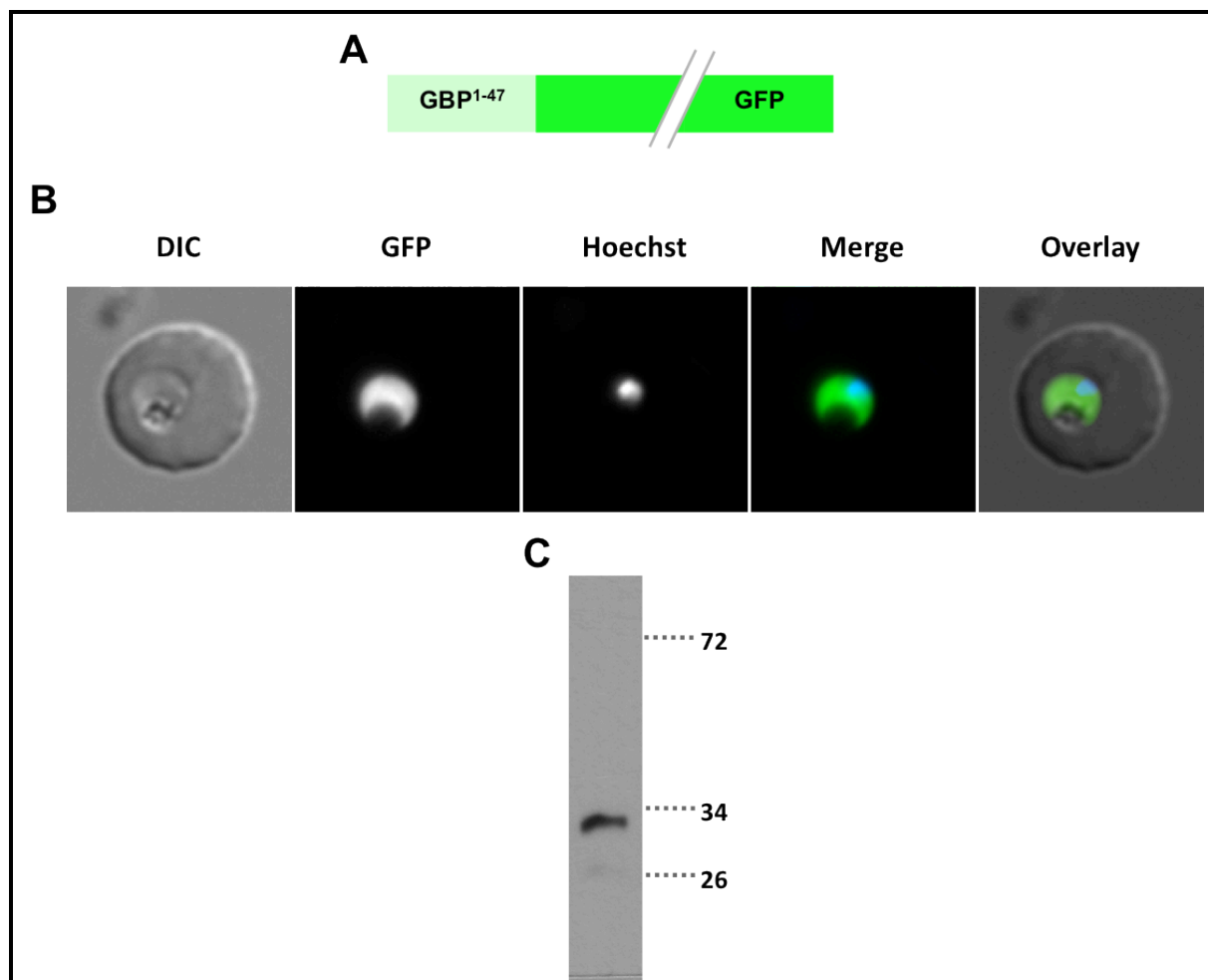


Abb. 6: Die ersten 47 AS von GBP 130 alleine vermitteln keinen Export des Reporterproteins. A) schematische Darstellung des Reporterproteins. B) Live Cell Aufnahmen der GBP¹⁻⁴⁷ Parasitenlinie zeigen eine Fluoreszenzsignal innerhalb des Parasiten. C) Western Blot Analyse: anti-GFP erkennt ein Fragment bei ca. 33 kDa. Gestrichelte Linie repräsentiert dem Prestained Marker 1 kDa Plus.

Als nächstes wurde die komplette N-terminale Verlängerung von GBP 130 mit einer artifiziellen N-terminalen Verlängerung ersetzt, um eine mögliche spezifische Wirkung der N-terminale Verlängerung auf den Export von GBP 130 zu untersuchen. Dabei wurden die ersten 47 AS der Glutathion-S-Transferase (GST) vor die hydrophobe Region und Exportsequenz von GBP 130 (AS 48-150) kloniert (Abb. 7A). Dieses Fusionsprotein wurde auch in die Wirtszelle exportiert (Abb. 7B). Diese Ergebnisse zeigen dass, eine artifizielle N-terminale Verlängerung auch den Export von GBP 130 in die Wirtszelle steuern können.

In den Western Blot Analyse kann man zwei Banden bei ca. 36 und 37 kDa erkennen (Abb. 7C, linke Spalte). Diese Banden, obwohl sie nicht genau die vorausgesagten Größen besitzen, entsprechen wahrscheinlich dem resultierenden Proteinfragment nach Abspaltung der Signalsequenz (37,3 kDa) und dem resultierenden Proteinfragment nach der Abspaltung der Export- (PEXEL-) Sequenz (34,7 kDa). Die darunterliegenden Banden bei 27 und 28 kDa entsprechen der Größe von GFP (27 kDa) und möglichen GFP Degradationsprodukten. Als Vergleich wurde GFP ohne Fusionsprotein aufgetragen (Abb. 7C, rechte Spalte).

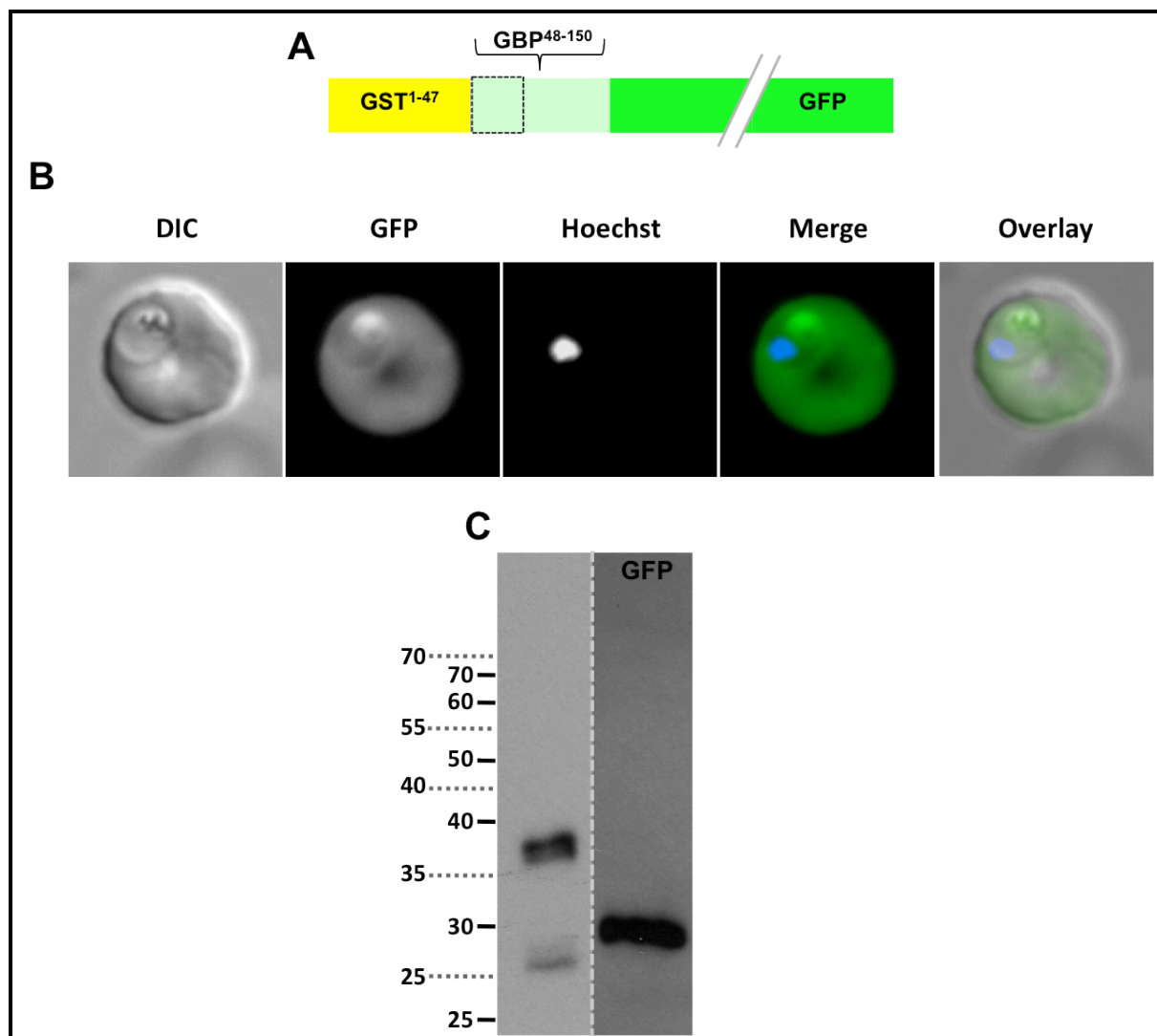


Abb. 7: Die AS 1-47 von GBP 130 können durch beliebige AS ersetzt werden. A) schematische Darstellung des Reporterproteins. Gestricheltes Viereck repräsentiert die h-Region. B) Live Cell Aufnahmen der GST¹⁻⁴⁷GBP⁴⁸⁻¹⁵⁰ Parasitenlinie zeigen eine Fluoreszenzsignal im Zytosol des Erythrozyten. C) Western Blot Analyse: anti-GFP erkennt einen Fragment bei ca. 37, 36, 28 und 27 kDa (linke Spalte). Rechte Spalte: anti-GFP erkennt den Fragment von GFP allein (29 kDa). Graue Gestrichelte Linie zwischen Spalten zeigt, dass

es um zwei entfernte Spuren des selben Blots handelt. Gestrichelte Linie: Prestained Marker; durchgehende Linie: Unstained Marker.

Diese Ergebnisse zusammen mit den Ergebnissen des vorherigen Abschnitts (Abb. 6) zeigen, dass die ersten 47 AS von GBP 130 keinen spezifischen Einfluss auf den Export von GBP 130 haben. Daraufhin wurde der mögliche Einfluss der N-terminalen Verlängerung von GBP 130 auf andere exportierte Proteine analysiert, die keine N-terminale Verlängerungen aufweisen.

4.2.2 Die ersten 47 AS von GBP 130 sind mit dem Export löslicher Proteine mit einer kanonischen Signalsequenz kompatibel

Als Nächstes wurde der Einfluss der N-terminalen Verlängerung von GBP 130 (die ersten 47 AS) auf exportierte lösliche Proteine mit einer kanonischen Signalsequenz untersucht. Für diese Experimente wurden die ersten 80 AS von STEVOR benutzt, die sowohl eine kanonische Signalsequenz, als auch eine PEXEL-Sequenz enthalten. Zunächst wurden die ersten 47 AS von GBP 130 vor die 80 AS von STEVOR kloniert (Abb. 8A), und als Kontrolle wurden die ersten 47 AS von GST ebenfalls vor die 80 AS von STEVOR fusioniert (Abb. 9A). In beiden Zelllinien $\text{GBP}^{1-47}\text{STEVOR}^{1-80}$ und $\text{GST}^{1-47}\text{STEVOR}^{1-80}$ war eine starke Fluoreszenz im Zytosol der Wirtszelle zu sehen (Abb. 8B & 9B), was einen klaren Hinweis auf Proteinexport darstellt. Nebenbei wurde in beiden Zelllinien ein perinukleäres Signal detektiert, was auf eine ER Lokalisierung hinweist. Dies ist durch eine teilweise inkorrekte Faltung des Reporterproteins zu erklären, ein oft beobachtetes Phänomen bei transgenen Zelllinien mit überexprimierten GFP Fusionsproteinen. Trotz dieser letzten Beobachtung kann man anhand dieser Ergebnisse keinen Effekt der ersten 47 AS von GBP 130 auf den Export löslicher Proteine mit kanonischer Signalsequenz erkennen.

Für das Konstrukt $\text{GBP}^{1-47}\text{STEVOR}^{1-80}$ ist, in den Western Blot Analysen, eine Bande bei ca. 31 kDa zu erkennen, die der Größe des resultierenden Proteinfragments nach Abspaltung der PEXEL-Sequenz (30,9 kDa) entspricht (Abb. 8B, linke Spalte). Die darunterliegenden Bande bei ca. 27 kDa entspricht der Größe von GFP (siehe GFP Vergleich auf der rechten Spalte). Für das Konstrukt $\text{GST}^{1-47}\text{STEVOR}^{1-80}$ findet man eine Bande bei ca. 33 kDa (Abb. 9C,

rechte Spalte). Die darunterliegende Bande ist wahrscheinlich ein Degradationsprodukt von GFP. Obwohl beide Konstrukte gleiche Größe haben und gleich innerhalb der PEXEL-Sequenz abgespalten werden, sind die Bande leicht unterschiedlich groß. Dies ist durch verschiedene Prozentigkeiten der Polyacrylamidgele zu erklären.

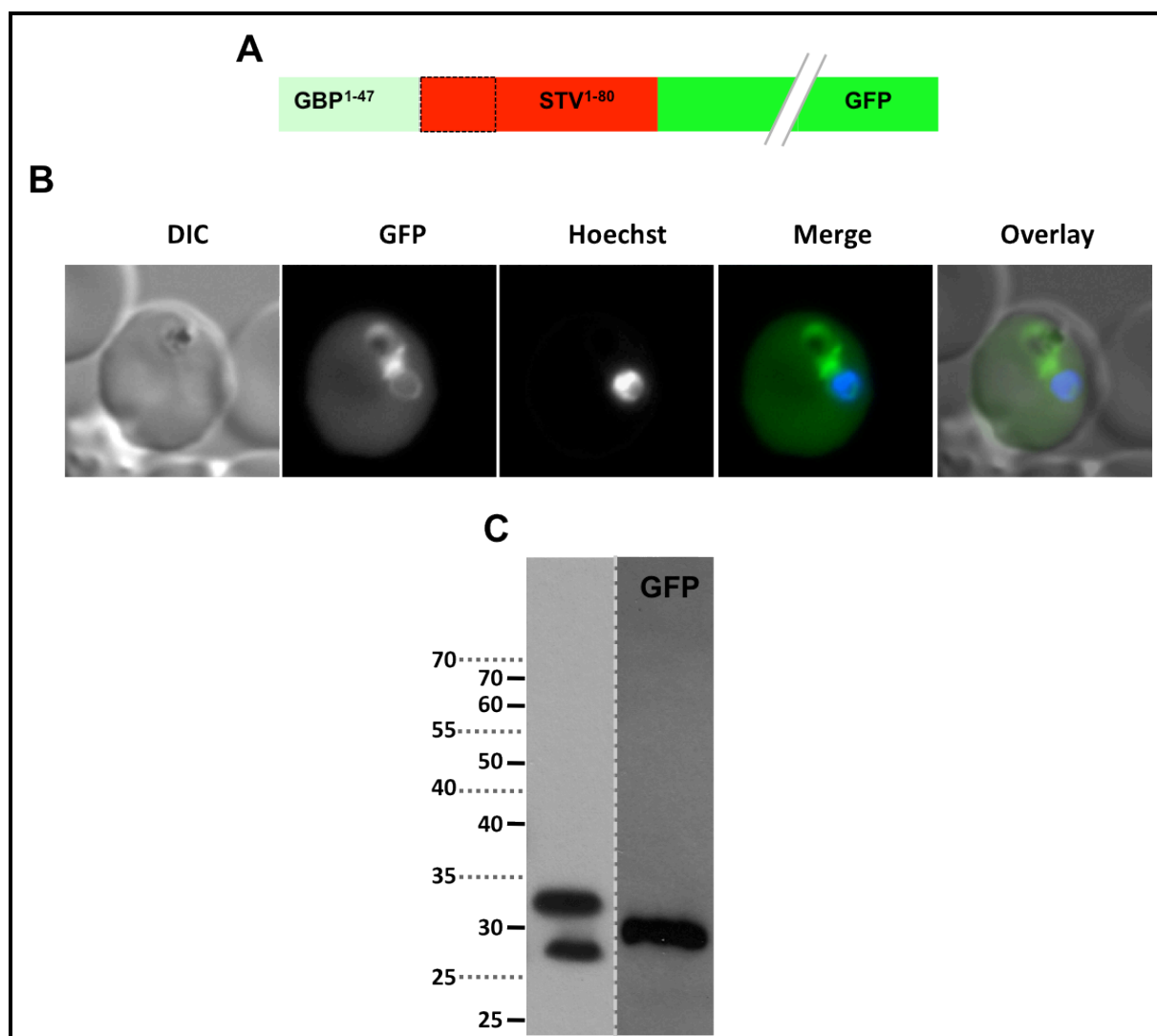


Abb. 8: die ersten 47 AS von GBP 130 sind dem Export eines mit einer kanonischen Signalsequenz löslichen Proteins kompatibel. A) schematische Darstellung des Reporterproteins. Gestricheltes Viereck repräsentiert die h-Region. B) Live Cell Aufnahmen der GBP¹⁻⁴⁷ STEVOR¹⁻⁸⁰ Parasitenlinie zeigen ein Fluoreszenzsignal im Zytosol des Erythrozyten. C) Western Blot Analyse: anti-GFP erkennt einen Fragment bei ca. 31 kDa und 27 kDa (linke Spalte). Rechte Spalte: GFP Fragment. Gestrichelte Linie: Prestained Marker; durchgehende Linie: Unstained Marker.

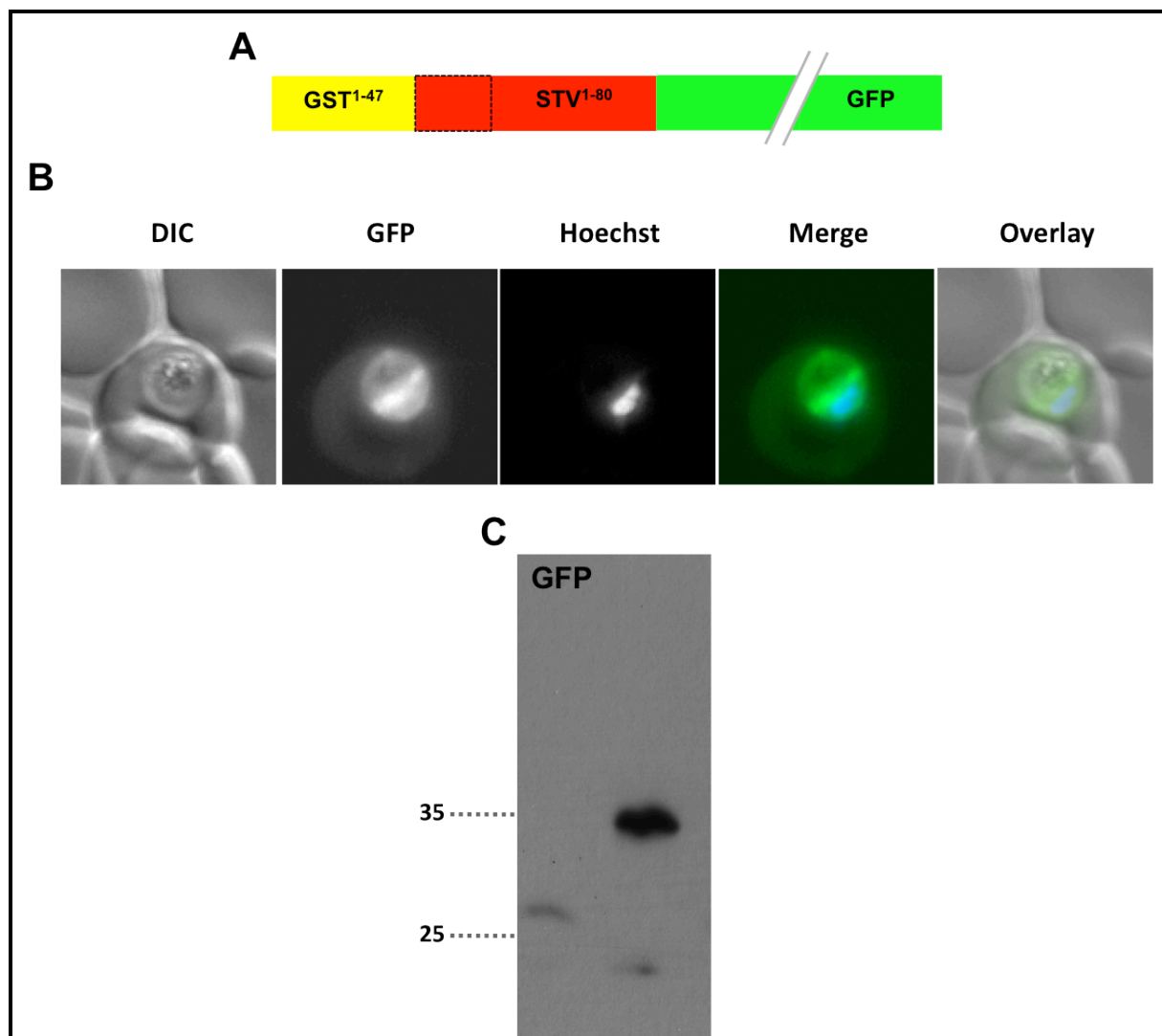


Abb. 9: auch andere 47 AS sind dem Export eines mit einer kanonischen Signalsequenz löslichen Proteins kompatibel. A) schematische Darstellung des Reporterproteins. Gestricheltes Viereck repräsentiert die h-Region. B) Live Cell Aufnahmen der GST¹⁻⁴⁷STEVOR¹⁻⁸⁰ Parasitenlinie zeigen ein Fluoreszenzsignal im Zytosol des Erythrozyten. C) Western Blot Analyse: anti-GFP erkennt einen Fragment bei ca. 33 kDa (rechte Spalte). Linke Spalte: GFP Fragment. Gestrichelte Linie: Prestained Marker.

4.2.3 Der N-Terminus von GBP 130 kann die kanonische Signalsequenz eines exportierten Membranproteins ersetzen

Wie bereits erwähnt, sind 90% aller vorhergesagten Proteine mit einer N-terminalen kanonischen Signalsequenz Membranproteine (siehe Abb. 5). Ziel dieses Experimentes war zu testen, ob der Austausch einer kanonischen Signalsequenz durch eine nichtkanonische, verlängerte Signalsequenz den Export eines Membranproteins beeinflussen kann. Als Modellprotein wurde STEVOR (in voller Länge) ausgewählt, ein Membranprotein, das in die Maurer's Clefts (MC) exportiert wird (Przyborski et al., 2005). Da die vorhergesagte Abspaltung der Signalsequenz von STEVOR nach AS 24 geschieht, wurden die ersten 24 AS von STEVOR mit den ersten 65 AS von GBP 130 (siehe Abb. 4C) ausgetauscht (Abb. 10A). Die Expression dieses Fusionsproteins zeigt ein gepunktetes Muster innerhalb des Erythrozyten, bezeichnend für eine Lokalisierung in den MC (Abb. 10B). Diese Lokalisierung konnte durch die Koloaliation mit dem MC Marker PfSBP1 (anti-PfSBP1) verifiziert werden (Abb. 10C). Diese Ergebnisse deuten an, dass der Besitz einer verlängerten Signalsequenz kompatibel mit dem Export von Membranproteinen ist.

Obwohl der Export dieses Fusionsproteins in die MC mittels IFA (Abb. 10C) verifiziert werden konnte, kann mittels Western Blot Analyse keine Bande detektiert werden, die der zu erwartenden Größe eines prozessierten Proteinfragments entspricht. Eine Bande bei 55,9 kDa (nach Abspaltung der Signalsequenz) und/oder eine Bande bei 52,8 kDa (nach Abspaltung von PEXEL) sind zu erwarten. Stattdessen werden zwei Banden bei ca. 63 kDa und ca. 65 kDa detektiert. Die 63 kDa Bande entspricht wahrscheinlich der Größe des unprozessierten Proteinfragments (63,2 kDa), ein Ergebnis, das mit den Ergebnissen der IFAs nicht übereinstimmt.

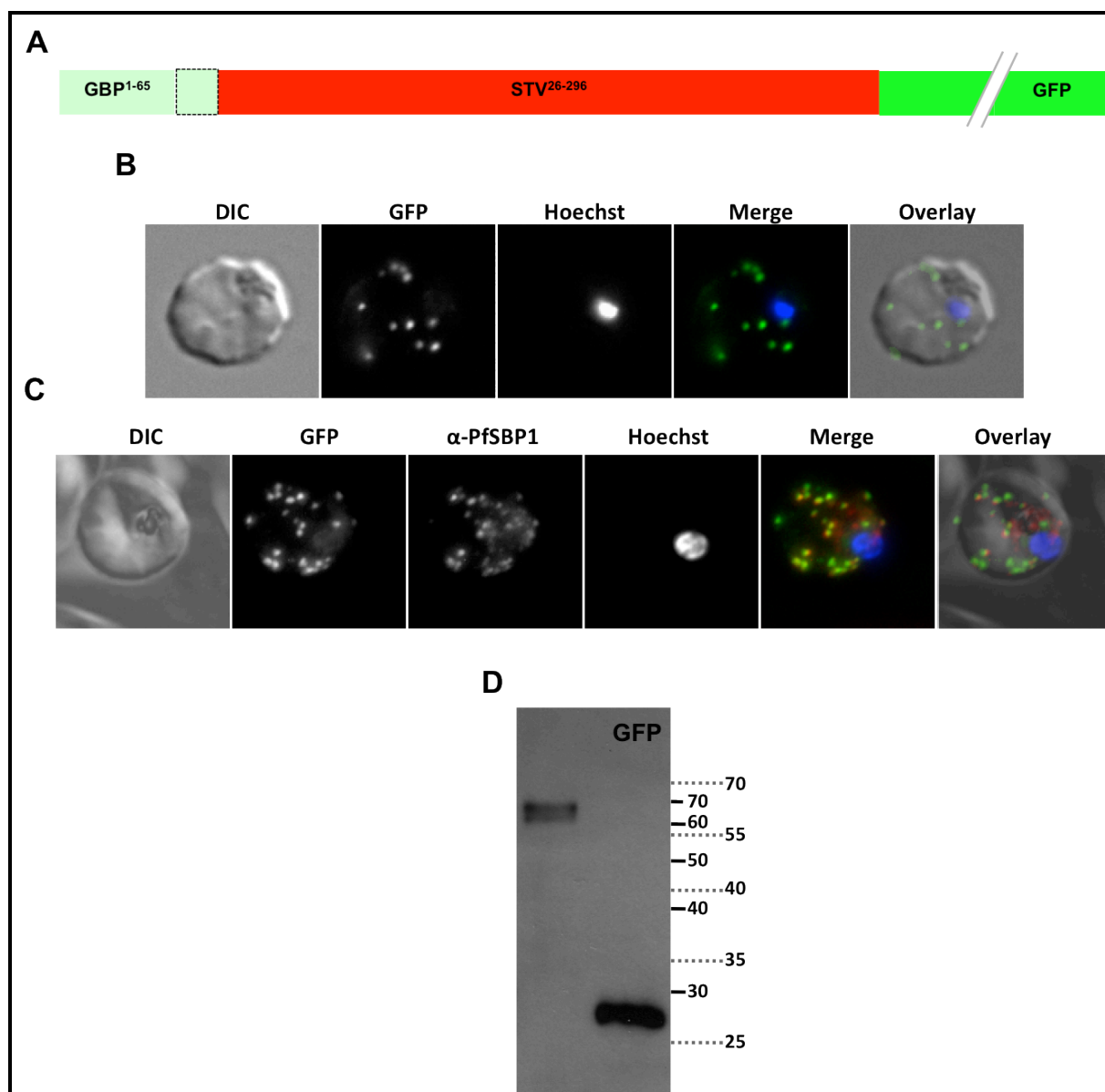


Abb. 10: die komplette verlängerte Signalsequenz von GBP 130 kann den Export von Membranproteinen vermitteln. A) schematische Darstellung des Reporterproteins. Gestricheltes Viereck repräsentiert die h-Region. B) Live Cell Aufnahmen der GBP¹⁻⁶⁵ STEVOR²⁴⁻²⁹⁶ Parasitenlinie zeigen ein gepunktetes Fluoreszenzmuster. C) IFA: anti-PfSBP1 Signal kolokalisiert mit dem GFP Signal. D) Western Blot Analyse: anti-GFP erkennt einen Fragment bei ca. 63 und 65 kDa (linke Spalte). Rechte Spalte: GFP Fragment. Gestrichelte Linie: Prestained Marker; durchgehende Linie: Unstained Marker.

4.2.4 Hinzufügen der N-terminale Verlängerung von GBP 130 oder einer artifiziellen Verlängerung zu der kanonischen Signalsequenz eines exportierten Membranproteins kann den Proteintransport bewirken

Als nächstes wurde untersucht, ob eine N-terminale Verlängerung zu der endogenen kanonischen Signalsequenz eines Membranproteins einen Effekt auf den Proteinexport hat. Als Model wurde wieder STEVOR ausgewählt. Dabei wurden die ersten 47 AS von GBP 130 oder die ersten 47 AS von GST vor die endogene kanonische Signalsequenz von STEVOR fusioniert (Abb. 11A & 12A). In beiden Fällen wurden zum wiederholten Male Fluoreszenz in der Nähe von MC detektiert (Abb. 11B & 12B). Diese Lokalisierung wurde wiederum mittels PfSBP1 verifiziert (Abb. 11C & 12C).

Auch zum wiederholten Mal traten widersprüchliche Ergebnisse in den Western Blot Analysen auf. Keine Bande ist zu sehen, die einem der prozessierten Proteinfragmente entspricht. Hier war eine Bande bei 57,8 kDa (nach Abspaltung der Signalsequenz) und/oder eine Bande bei 54,1 kDa (nach Abspaltung von PEXEL) für beide Konstrukte zu erwarten. Stattdessen wird eine Bande bei ca. 70 kDa für GBP¹⁻⁴⁷STEVOR¹⁻²⁹⁶ beobachtet, die zu groß für das erwartete unprozessierte Proteinfragment ist (65,9 kDa). Für GST¹⁻⁴⁷STEVOR¹⁻²⁹⁶ wird eine Bande bei ca. 60 kDa detektiert, die in diesem Falle zu klein für das erwartete unprozessierte Proteinfragment ist (64,4 kDa).

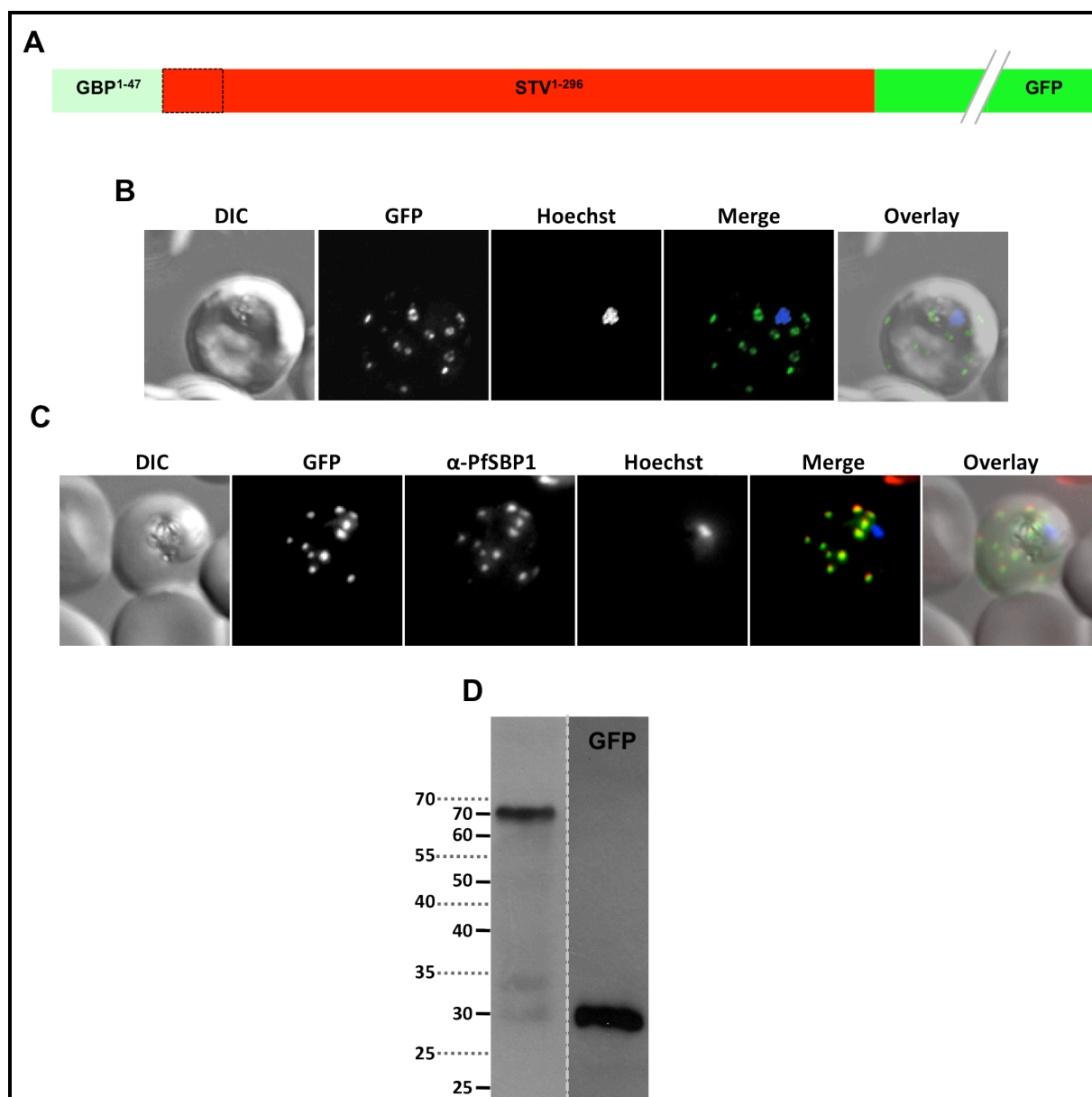


Abb. 11: die ersten 47 AS von GBP 130 haben keinen Einfluss auf die Endbestimmung von Membranproteinen. A) schematische Darstellung des Reporterproteins. Gestricheltes Viereck repräsentiert die h-Region. B) Live Cell Aufnahmen der GBP¹⁻⁴⁷STEVR¹⁻²⁹⁶ Parasitenlinie zeigen ein gepunktetes Fluoreszenzmuster. C) IFA: anti-PfSBP1 Signal kolokalisiert mit dem GFP Signal. D) Western Blot Analyse: anti-GFP erkennt einen Fragment ca. 70 kDa (linke Spalte). Rechte Spalte: GFP Fragment. Gestrichelte Linie: Prestained Marker; durchgehende Linie: Unstained Marker.

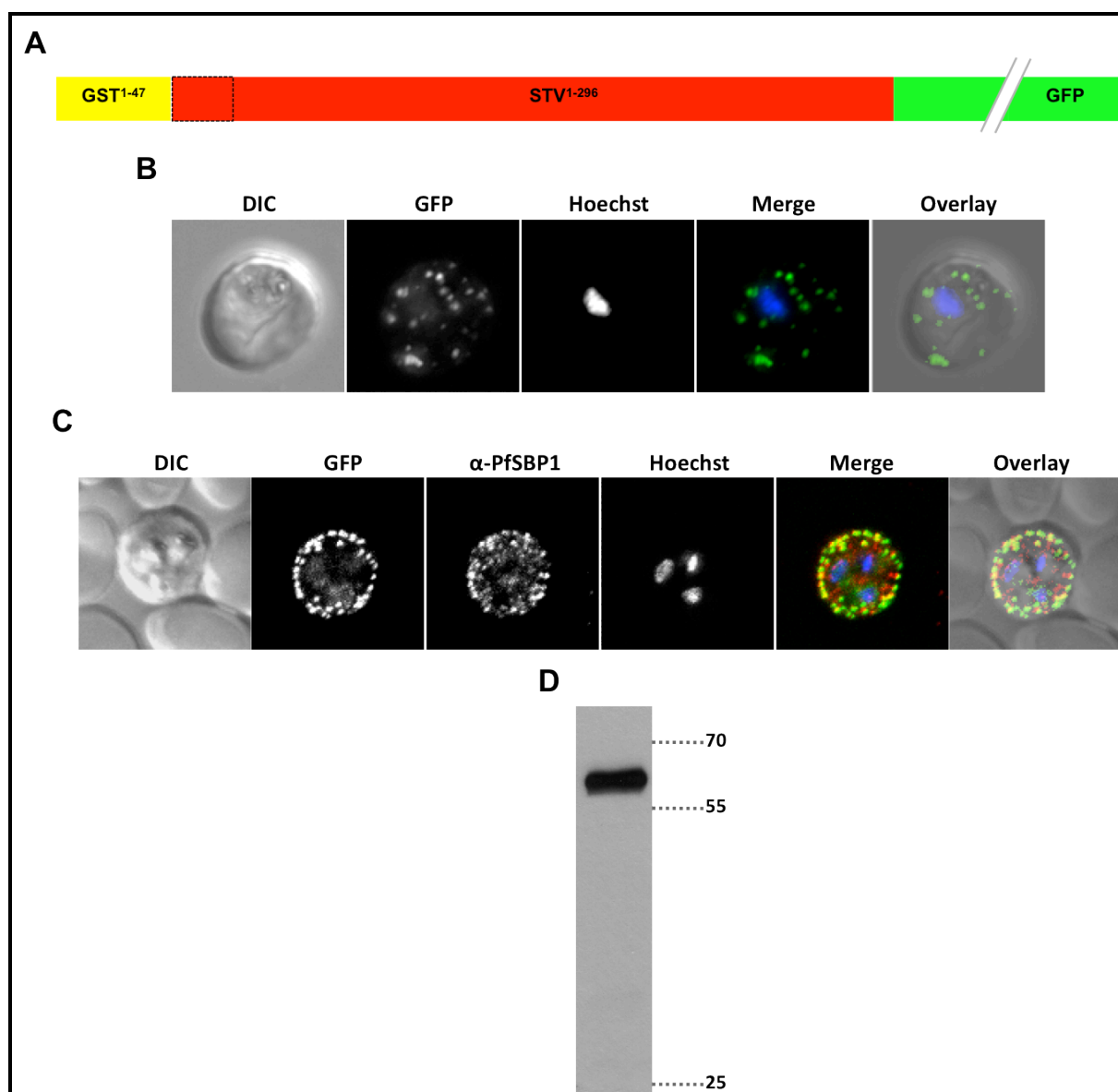


Abb. 12: auch andere artifizielle 47 AS haben keinen Einfluss auf die Endbestimmung von Membranproteinen. A) schematische Darstellung des Reporterproteins. Gestricheltes Viereck repräsentiert die h-Region. B) Live Cell Aufnahmen der GST¹⁻⁴⁷STEVR¹⁻²⁹⁶ Parasitenlinie zeigen ein gepunktetes Fluoreszenzmuster. C) IFA: anti-PfSBP1 Signal kolokalisiert mit dem GFP Signal. D) Western Blot Analyse: anti-GFP erkennt einen Fragment ca. 60 kDa. Gestrichelte Linie: Prestained Marker.

4.2.5 Der verkürzte N-Terminus von GBP 130 kann den Export eines Membranproteins antreiben

Die letzten Ergebnisse deuten darauf hin, dass N-terminale Verlängerungen keine essentielle Rolle beim Export von Membranproteinen spielen. Als nächstes wurde getestet, ob die h-Region von GBP 130 alleine den Eintritt von Membranproteinen in den sekretorischen Weg einleiten kann. Dafür wurde die endogene Signalsequenz von STEVOR durch die 48-65 AS (h-Region) von GBP 130 ersetzt (Abb. 13A). Wieder konnte ein starker Export in die MC beobachtet werden, der auch mittels PfSBP1 verifiziert werden konnte (Abb. 13B & 13C).

In den Western Blot Analysen wird wieder das PEXEL-prozessierte Proteinfragment (54,1kDa) vermisst. Eine Bande bei ca. 56 kDa ist zu sehen, die der Größe des unprozessierten Proteinfragments (59,4 kDa) entsprechen könnte.

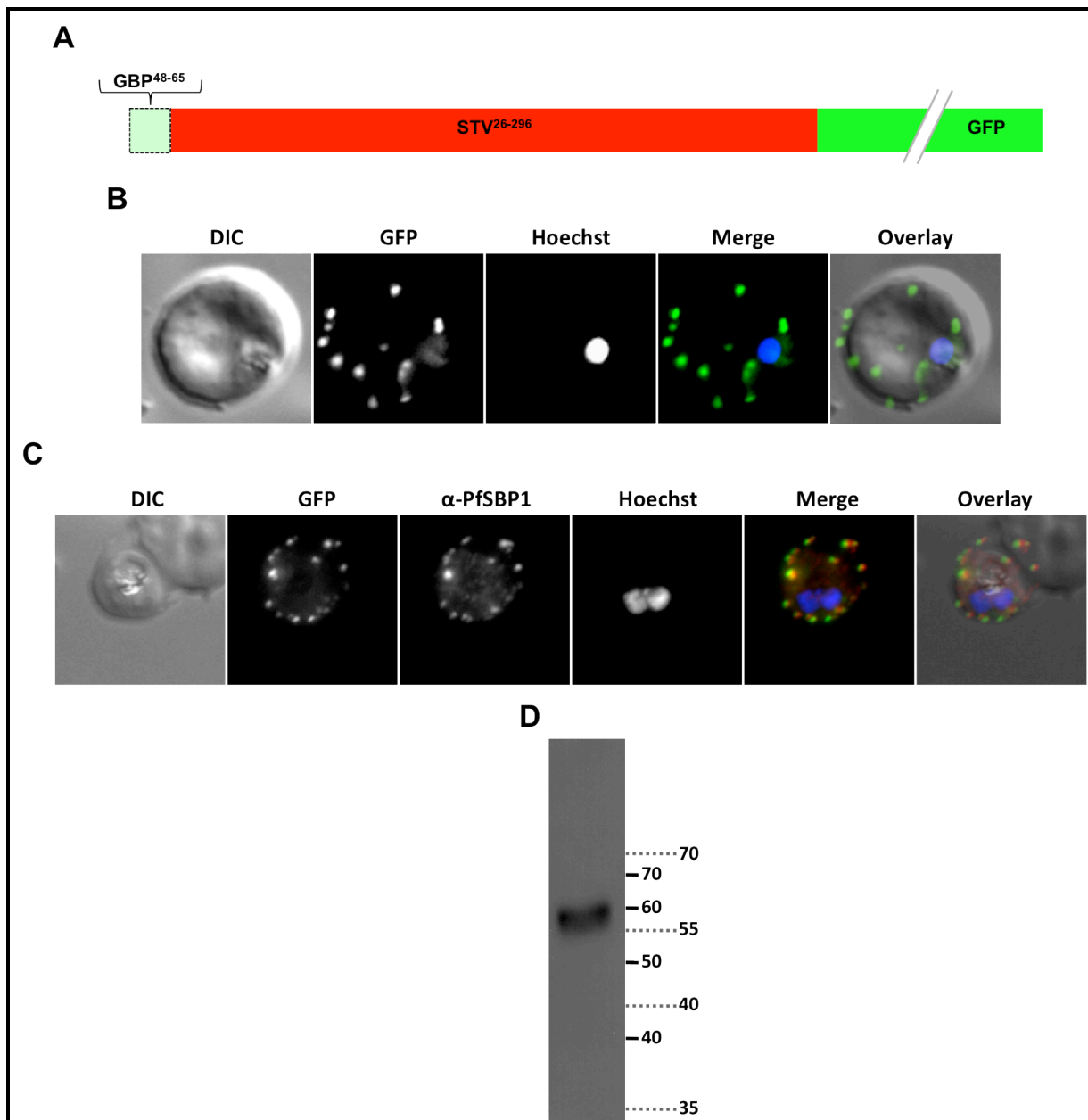


Abb. 13: auch die h-Region von GBP 130 kann den Export von Membranproteinen vermitteln. A) schematische Darstellung des Reporterproteins. Gestricheltes Viereck repräsentiert die h-Region. B) Live Cell Aufnahmen der GBP⁴⁸⁻⁶⁵STEVOR²⁴⁻²⁹⁶ Parasitenlinie zeigen ein gepunktetes Fluoreszenzmuster. C) IFA: anti-PfSBP1 Signal kolokalisiert mit dem GFP Signal. D) Western Blot Analyse: anti-GFP erkennt einen Fragment ca. 56 kDa. Gestrichelte Linie: Prestained Marker; durchgehende Linie: Unstained Marker.

4.2.6 Die Signalsequenz von GBP 130 mit und ohne die ersten 47 AS kann die kanonische Signalsequenz eines Apikoplastproteins ersetzen

Wie es im Abschnitt 1.4.1 erklärt wurde, eines der Ziele der sekretorischen Proteinen von *Plasmodium* ist der Apikoplast. Proteine, die in den Apikoplast exportiert werden sollen, besitzen eine kanonische Signalsequenz, die den Transport in den sekretorischen Weg einleitet und einen Transitpeptid, das den Transport über die Membranen des Apikoplast bewirkt. Um den Effekt der N-terminale Verlängerung von GBP 130 auf den Export von Apikoplastproteinen zu untersuchen, wurde eine Parasitenlinie generiert, die die ersten 65 AS von GBP 130 fusioniert mit dem Transitpeptid von Acyl Carrier Protein (ACP) exprimiert. Dazu wurde die h-Region von GBP 130 (48-65 AS) vor das Transitpeptid von ACP fusioniert (Abb. 14A & 15A). In beiden Parasitenlinien wurde eine Mischung von Fluoreszenz Phänotypen detektiert: einen kleinen hellen Punkt, typisch für den Apikoplast und einen den Parasiten umgebenden Rand (Abb. 14B & 15B). Der helle Punkt wurde mittels Apikoplast Marker ACP als Apikoplast verifiziert (Abb. 14C & 15C). Die Signale um den Parasiten entsprechen wahrscheinlich dem Lumen der PV. Das Lumen der PV ist das Endziel sekretorischer Proteine, die keine weiteren Targeting Signale besitzen, wie z.B. das Transitpeptid apikoplast-lokalisierter Proteine. Möglicherweise ist durch das Fusionieren der beiden Sequenzen eine unkonventionelle Schnittstelle für die Signalpeptidase entstanden, was eine unvollständige Erkennung des Transitpeptids zu Folge hatte, was wiederum zu der Sekretion des Fusionsproteins in das Lumen der PV geführt hatte.

Gelegentlich wurde eine leichte Fluoreszenz innerhalb der Wirtszelle beobachtet (Abb. 15D).

Für beide Fusionsproteine war eine Bande bei 29,9 kDa zu erwarten. Diese Bande entspricht dem resultierenden Fragment nach der Prozessierung des Transitpeptids. Bei GBP⁴⁸⁻⁶⁵ACP^{TP} (Abb. 15E) und GBP¹⁻⁶⁵ACP^{TP} (Abb. 14D) ist diese Bande erkennbar.

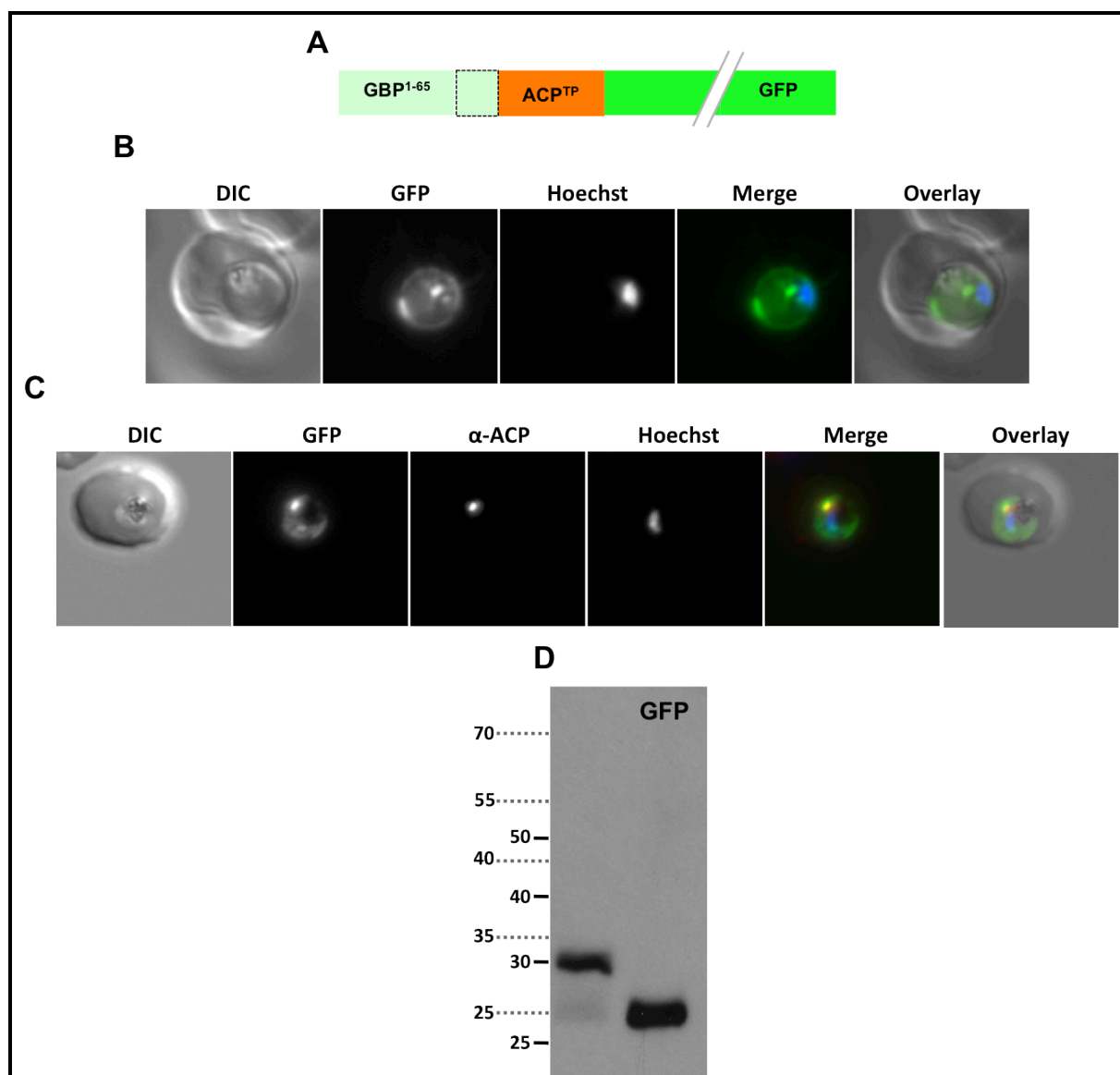


Abb. 14: die verlängerte Signalsequenz von GB 130 kann die kanonische Signalsequenz eines Apikoplastproteins ersetzen. A) schematische Darstellung des Reporterproteins. Gestricheltes Viereck repräsentiert die h-Region. B) Live Cell Aufnahmen der **GBP¹⁻⁶⁵ACP^{TP}** Parasitenlinie zeigen zwei verschiedene Fluoreszenzsignale: einen hellen Punkt und einen den Parasiten umgebenden Ring. C) IFA: anti-ACP Signal kolokalisiert mit dem hellen Punkt. D) Western Blot Analyse: anti-GFP erkennt ein Fragment ca. 30 kDa. Gestrichelte Linie: Prestained Marker; durchgehende Linie: Unstained Marker.

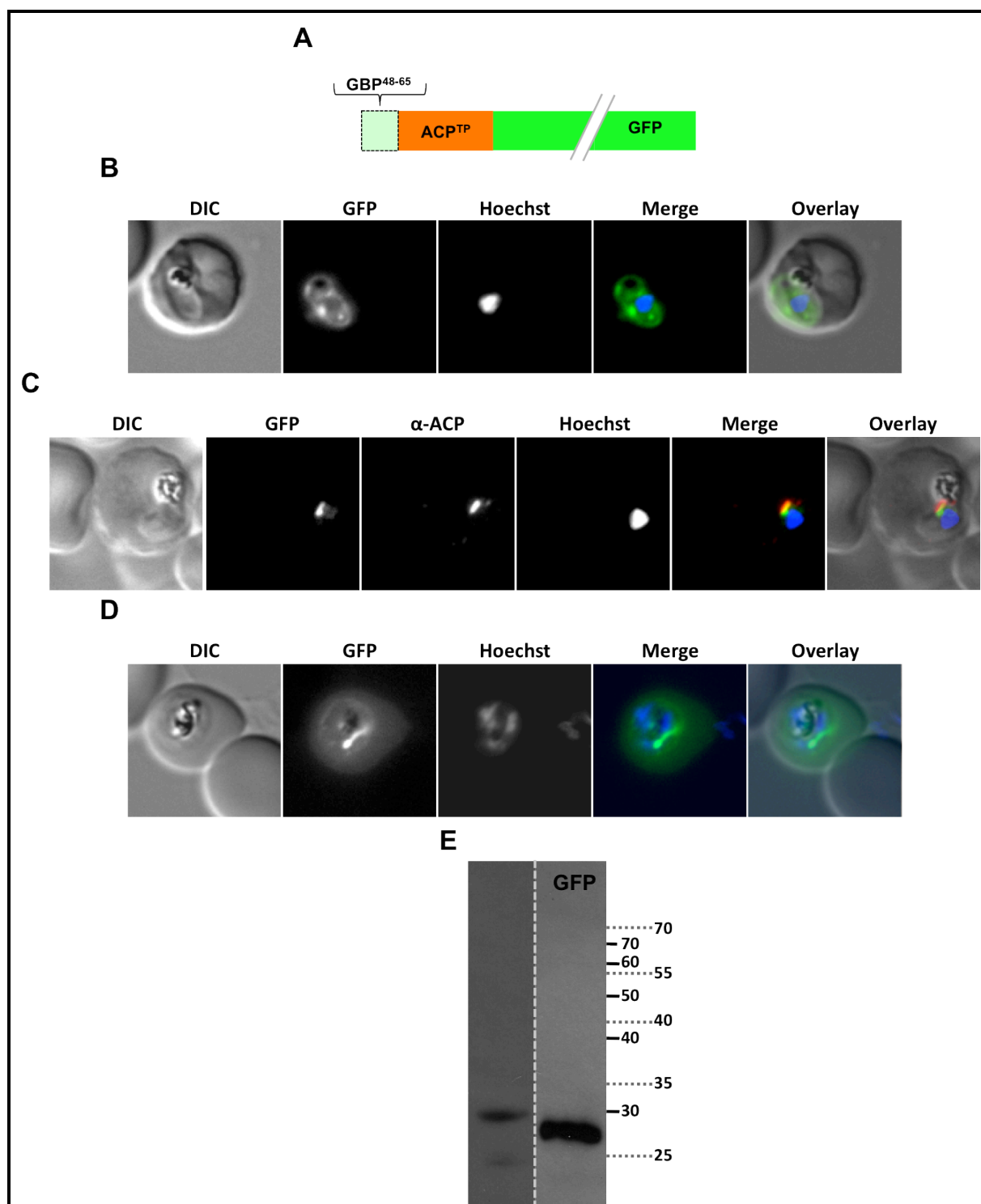


Abb. 15: die h-Region von GBP 130 ist ausreichend um den Transport eines Apikoplastproteins zu steuern. A) schematische Darstellung des Reporterproteins. Gestricheltes Viereck repräsentiert die h-Region. B) Live Cell Aufnahmen der GBP⁴⁸⁻⁶⁵ ACP^{TP} Parasitenlinie zeigen zwei verschiedene Fluoreszenzsignale: einen hellen Punkt und einen den Parasiten umgebenden Ring. C) IFA: anti-ACP Signal kolokalisiert mit dem hellen Punkt. Zusätzlich wird ein Fluoreszenzsignal im Zytosol des Erythrozyten beobachtet (D). E) Western Blot Analyse: anti-GFP erkennt einen Fragment ca. 30 kDa (linke Spalte). Rechte

Spalte: GFP Fragment. Gestrichelte Linie: Prestained Marker; durchgehende Linie: Unstained Marker.

4.3 Untersuchung der Sekretion von *Plasmodium* Proteinen in Humanzellen

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob die verlängerte Signalsequenz von GBP 130 eine für *Plasmodiums* sekretorischen Weg spezifische Erkennungssignal ist. Translation-Translokation Experimente in Mikrosomen von Säugetieren haben gezeigt, dass *Plasmodium* Proteine in einem zellfreien System auch erkannt werden konnten (siehe Abschnitt 1.8). In unserem Labor wurde zudem die Expression von *Plasmodium* Proteinen in dem nah verwandten Apikomplexa Parasit *Toxoplasma gondii* untersucht (Franziska Geis, BSc). Die Ergebnisse dieser Untersuchung, deuteten darauf hin, dass GBP 130 vom *T. gondii* sekretorischen Weg zumindest erkannt wird. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal untersucht, ob Signalsequenzen von *Plasmodium* Proteinen, insbesondere GBP 130, von Humanzellen erkannt werden können.

Um diese Frage zu beantworten wurde die Signalsequenz von GBP 130 mit und ohne die ersten 47 AS und die Signalsequenz von Exp-1, ein Protein mit einer kanonischen Signalsequenz, transient in Huh7 Humanzellen (Leberkarzinomzellen) transfiziert. Danach wurden die transfizierten Zellen mit Brefeldin A (BFA) behandelt, um den möglichen Eintritt der *Plasmodium* Proteine in den sekretorischen Weg der Humanzellen beobachten zu können. BFA ist eine gut charakterisierte Droge, die angewendet wird um die Sekretion von Proteinen in eukaryotischen Zellen zu untersuchen. BFA hemmt den retrograden Transport vom Golgi Apparat zu ER, was zur Folge hat, dass der Golgi kollabiert und mit dem ER verschmilzt (Doms et al., 1989; Klausner et al., 1992).

Anschließend wurden IFAs von den Zellen mit und ohne BFA Behandlung gemacht.

4.3.1 GFP alleine wird nicht in den sekretorischen Weg der Humanzellen aufgenommen

Als erstes sollte sichergestellt werden, dass GFP alleine in den Humanzellen nicht sezerniert wird. In den IFAs (Abb. 16) sieht man, dass das GFP Fluoreszenzsignal über das ganze

Zytosol der Humanzelle verteilt ist, ungeachtet einer Behandlung mit BFA. Als Golgi Marker wurde der Anti-58K Golgi Protein Antikörper (A-58K) benutzt. Der Marker zeigt die typische Fluoreszenzverteilung des Golgi Apparates der Humanzelle in der Nähe des Zellkerns, und keine Kolokalisation mit der GFP Fluoreszenzsignal ist zu erkennen. Nach der BFA Behandlung erkennt man, dass sich das distinkte Fluoreszenzsignal des Golgi Markerproteins, wie zu erwarten, aufgelöst hat.

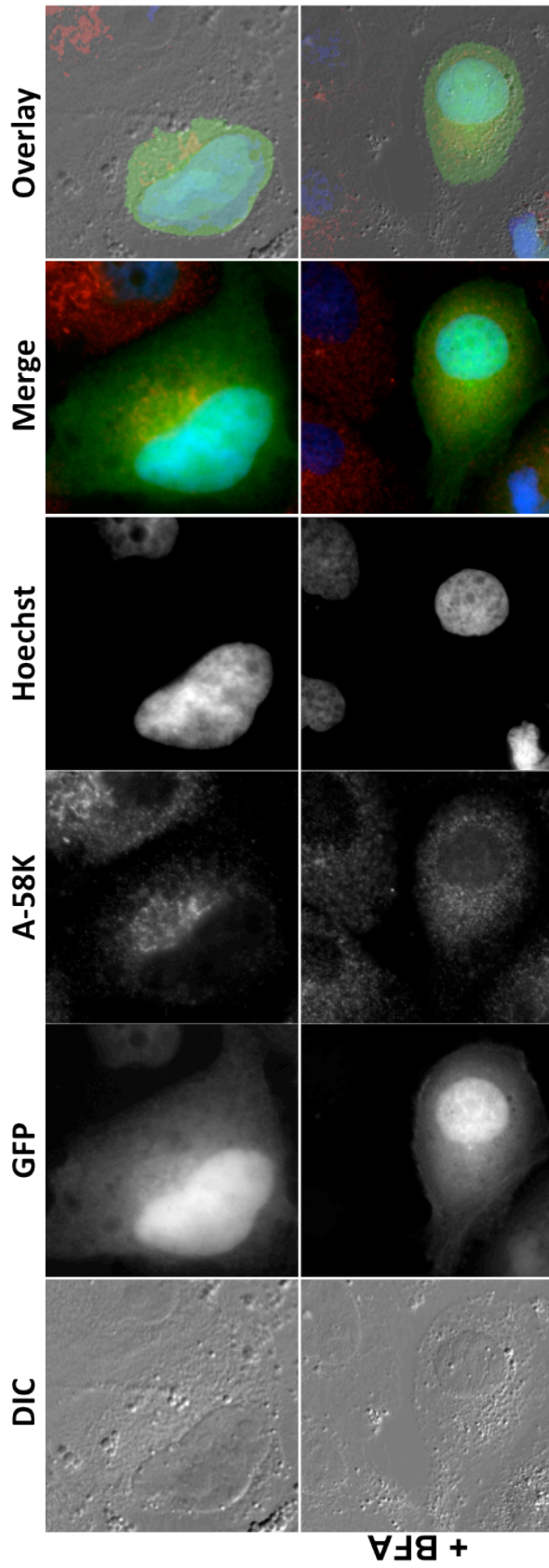


Abb. 16: GFP alleine tritt nicht in den sekretorischen Weg der Humanzellen ein. IFA der Huh7 Humanzellen transfiziert mit einem Plasmid, das nur für GFP kodiert. Obere Reihe: GFP Fluoreszenzsignal ist über das ganze Zytosol der Zelle verteilt. Der Golgi Marker A-58K zeigt die typische Verteilung des Golgi Apparates und zeigt keine Kolo-kalisation mit der GFP Signal. Untere Reihe: nach Behandlung mit BFA bleibt die Verteilung des GFP Fluoreszenzsignals unverändert und das Signal des Golgi Markers findet sich über die ganze Zelle verteilt.

4.3.2 Signalsequenz von Exp-1 dirigiert das Reporterprotein in den sekretorischen Weg der Humanzellen

Da die Translation und Insertion von Exp-1 in Mikrosomen von Säugetieren sehr gut beschrieben ist (Günther et al., 1991), wurde dieses Protein als Kontrolle ausgewählt. Zudem besitzt Exp-1 eine kanonische Signalsequenz. Die ersten 35 AS von Exp-1 wurden vor GFP kloniert. In den ersten 35 AS ist die Signalsequenz enthalten, nicht aber die anschließende PEXEL Sequenz, da es davon auszugehen ist, dass die für *Plasmodium* spezifische PEXEL Sequenz nicht in Humanzellen prozessiert wird. In den IFAs (Abb. 17) erkennt man das GFP Fluoreszenzsignal akkumuliert in der Nähe des Zellkerns in den Zellen ohne BFA Behandlung. Das GFP Fluoreszenzsignal kolokalisiert teilweise mit dem Fluoreszenzsignal des Golgi Markers. Die mit BFA behandelten Zellen hingegen zeigen eine diffuse Fluoreszenzverteilung, sowohl für GFP als auch für den Golgi Marker. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis dafür, dass die Signalsequenz von Exp-1 in den sekretorischen Weg der Huh7 Humanzellen eingetreten ist.

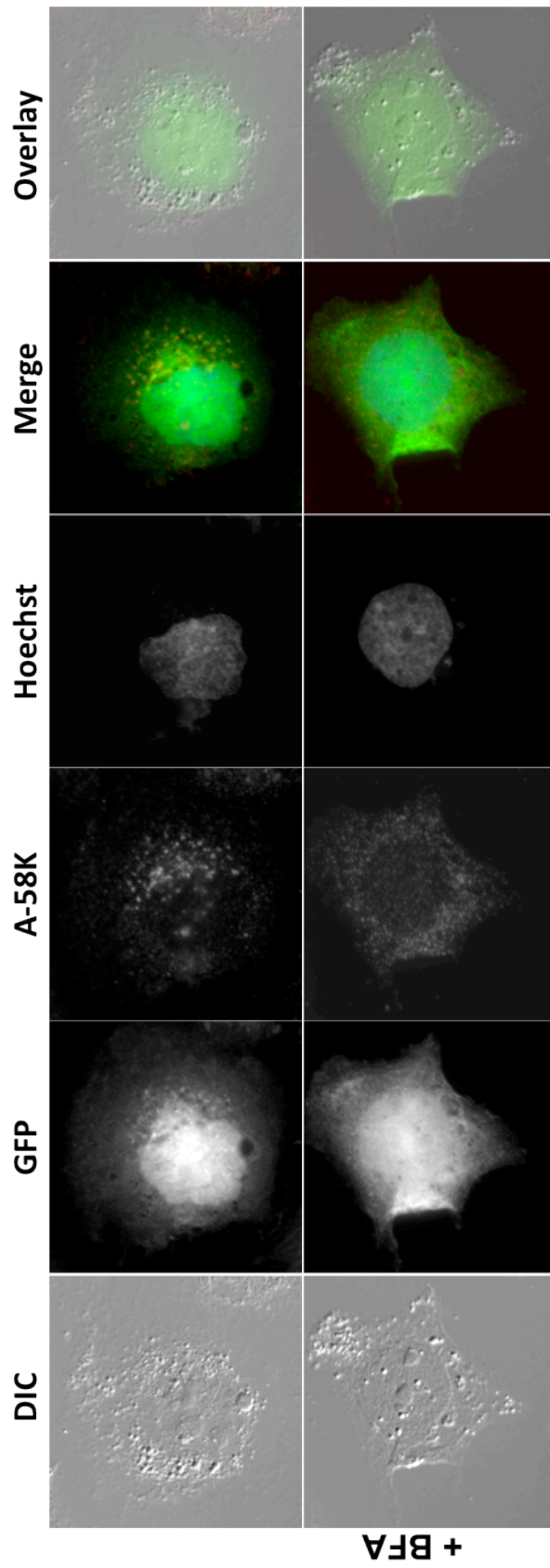


Abb. 17: Signalsequenz von Exp-1 tritt in den sekretorischen Weg der Humanzellen ein. IFA der Huh7 Humanzellen transfiziert mit dem Exp-1¹⁻³⁵ GFP Plasmid. Obere Reihe: GFP Fluoreszenzsignal befindet sich teilweise in der Nähe des Golgi Apparates. Der Golgi Marker A-58K zeigt die typische Verteilung des Golgi Apparates und zeigt eine partielle Kollokalisierung mit dem GFP Signal. Untere Reihe: nach Behandlung mit BFA löst sich die Kollokalisierung von GFP und des Golgi Markers auf.

4.3.3 Signalsequenz von GBP 130 mit und ohne N-terminale Verlängerung dirigiert das Reporterprotein in den sekretorischen Weg der Humanzellen

Um zu testen, ob die Signalsequenz von GBP 130 mit den ersten 47 AS vom sekretorischen Weg der Huh7 Humanzellen erkannt werden kann, wurden die ersten 83 AS von GBP 130 mit der verlängerten Signalsequenz und ohne das PEXEL Motiv vor GFP kloniert. Die IFAs (Abb. 18) zeigen eine partielle Kolokalisation der GFP- und Golgi Marker Fluoreszenzsignale. In den mit BFA behandelten Zellen findet man, wie erwartet, ein über die ganze Zelle verteiltes Fluoreszenzsignal für GFP, wie auch für den Golgi Marker. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Signalsequenz von GBP 130 mit der N-terminalen Verlängerung auch vom sekretorischen Weg der Huh7 Humanzellen erkannt werden kann.

Als nächstes sollte überprüft werden, ob dieses Eintreten der Signalsequenz von GBP 130 in den sekretorischen Weg der Humanzellen durch die N-terminale Verlängerung vermittelt wird. Um das zu untersuchen, wurde die Signalsequenz von GBP 130 ohne die ersten 47 AS vor GFP kloniert. Die IFAs (Abb. 19) zeigen einen ähnlichen Phänotyp, wie die IFAs mit dem GBP¹⁻⁸³ GFP Konstrukt, was die Annahme nahelegt, dass GBP 130 nicht mittels der N-terminalen Verlängerung vom sekretorischen Weg der Humanzellen erkannt wird.

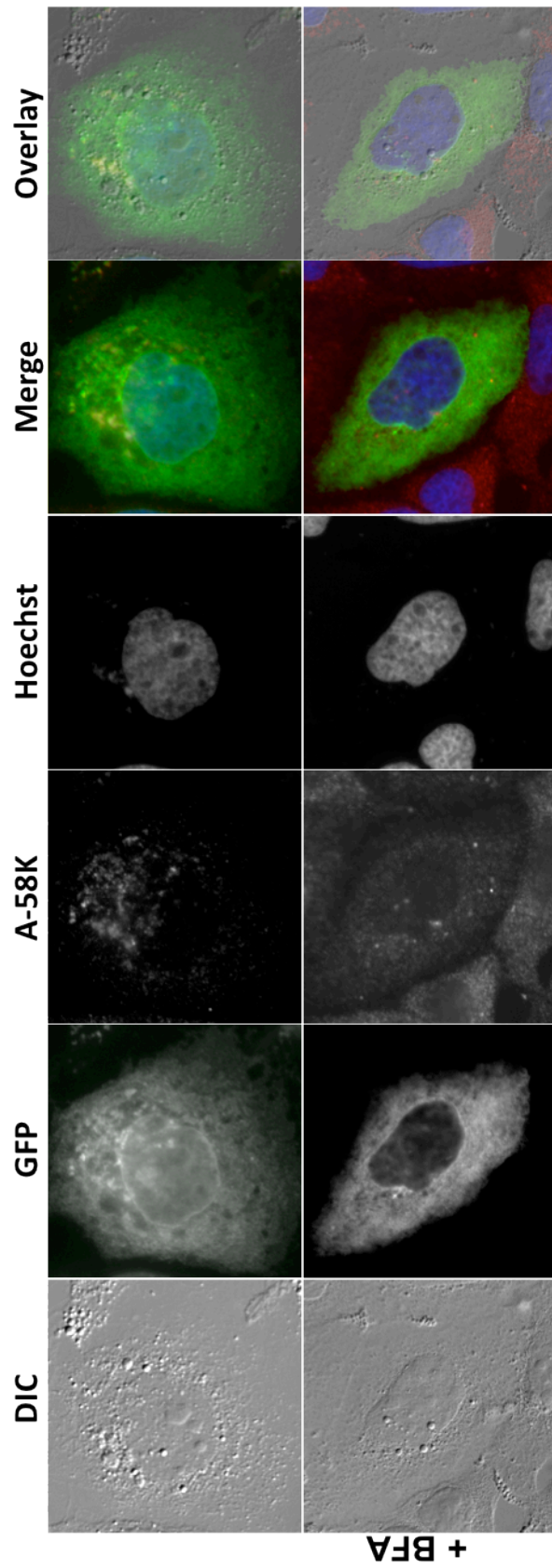


Abb. 18: Signalsequenz von GBP 130 mit der N-terminalen Verlängerung tritt in den sekretorischen Weg der Humanzellen ein. IFA der Huh7 Humanzellen transfiziert mit dem GBP¹⁻⁸³GFP Plasmid. Obere Reihe: GFP Fluoreszenzsignal befindet sich teilweise in der Nähe des Golgi Apparates. Der Golgi Marker A-58K zeigt die typische Verteilung des Golgi Apparates und zeigt eine partielle Kolokalisation mit dem GFP Signal. Untere Reihe: nach Behandlung mit BFA löst sich die Kolokalisation von GFP und des Golgi Markers auf.

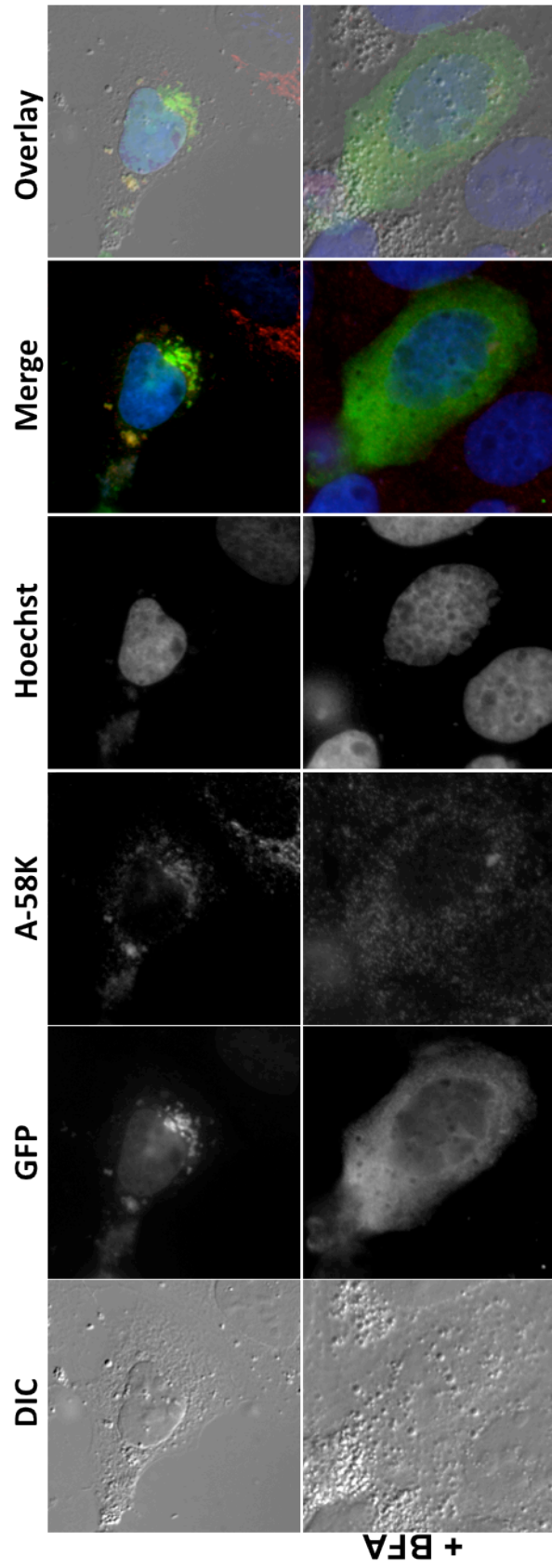


Abb. 19: Signalsequenz von GBP 130 ohne die N-terminale Verlängerung tritt in den sekretorischen Weg der Humanzellen ein. IFA
 der Huh7 Humanzellen transfiziert mit dem GBP⁴⁸⁻⁸³GFP Plasmid. Obere Reihe: GFP Fluoreszenzsignal befindet sich teilweise in der Nähe des Golgi Apparates. Der Golgi Marker A-58K zeigt die typische Verteilung des Golgi Apparates und zeigt eine partielle Kollokalisierung mit der GFP Signal. Untere Reihe: nach Behandlung mit BFA lösen sich die Kollokalisierung von GFP und dem Golgi Marker auf.

5. Diskussion

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der mögliche Effekt der N-terminalen Verlängerung (der ersten 47 AS) von GBP 130 auf den Transport anderer *Plasmodium* Proteine mit verschiedenen intrazellulären Lokalisierungen untersucht. *in silico* Analysen der vorhergesagten exportierten Proteinen von *Plasmodium falciparum* haben auf eine Verbindung zwischen Art der Signalsequenz und Art des Proteins hingedeutet. Dabei wurde beobachtet, dass 90% der exportierten Membranproteinen eine kanonische Signalsequenz besitzen und dass 80% der exportierten löslichen Proteinen eine nichtkanonische Signalsequenz aufweisen (Abb. 5). In dieser Arbeit wurde auch überprüft, ob tatsächlich eine Verbindung zwischen Art der Signalsequenz und Art des Proteins gibt.

Der mögliche Effekt der ersten 47 AS von GBP 130 wurde auf die Sekretion einer gut charakterisierten kanonischen Signalsequenz getestet. Dabei handelte sich um die Signalsequenz von STEVOR. Zu unseren Zwecken konnte STEVOR als Modellprotein für lösliche Proteine (STEVOR¹⁻⁸⁰) und für Membranproteine (STEVOR¹⁻²⁹⁶) verwendet werden. Weder das Hinzufügen der N-terminalen Verlängerung von GBP 130 an die kanonische Signalsequenz von STEVOR noch das Ersetzen der kompletten kanonischen Signalsequenz von STEVOR durch die verlängerte Signalsequenz von GBP 130, konnte den Export beider STEVOR Varianten zu ihren Bestimmungsorten innerhalb der Wirtszelle beeinflussen (Abb. 8-13).

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die N-terminale Verlängerung von GBP 130 keinen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisierung der getesteten Proteine hat, weder von Membranproteinen noch von löslichen Proteinen. Eine Verbindung zwischen Art der Signalsequenz und Art des Proteins konnte nicht, zumindest in den Varianten unseres Modellproteins, festgestellt werden.

Interessanterweise sind bei den Western Blot Analysen bei den Membranproteinen (GBP¹⁻⁶⁵STEVOR²⁴⁻²⁹⁶, GBP¹⁻⁴⁷STEVOR¹⁻²⁹⁶, GST¹⁻⁴⁷ STEVOR¹⁻²⁹⁶ und GBP⁴⁸⁻⁶⁵STEVOR²⁴⁻²⁹⁶, Abb. 10-13) keine Banden detektierbar, die den zu erwartenden prozessierten Proteinfragmente entspricht. Mittels Kolokalisationsversuchen konnte jedoch die korrekte intrazelluläre Lokalisierung dieser Proteine verifiziert werden. Wie im Abschnitt 2 (Abb. 5) erwähnt wurde, besitzen 90% der Membranproteinen eine kanonische Signalsequenz. Vielleicht werden diese Proteine nach Verlängerung der Signalsequenz in einer bis jetzt

unbekannten Art prozessiert. Die gleichen Experimente sollten mit anderen Membranproteinen gemacht werden, um dies zu überprüfen. Unsere Modelle für Membranprotein (STEVR¹⁻²⁹⁶) und für lösliche Proteine (STEVR¹⁻⁸⁰) besitzen die gleiche kanonische Signalsequenz (und die gleiche PEXEL Sequenz) und wurde in gleicher Form mit der nichtkanonischen Signalsequenz von GBP 130 verlängert oder durch diese ersetzt. Das heißt, die Signalsequenz hätte in allen Fällen gleich prozessiert werden müssen. Keine Erklärung für diese Ergebnisse konnte gefunden werden. Um die Prozessierung der Proteinfragmente genauer zu erleuchten, müssen diese Proteinfragmente über MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert werden (Boddey et al., 2010; Chang et al., 2008; Haase et al., 2009). Diese Analyse konnte aus Zeitmangel hier nicht durchgeführt werden.

Da Apikoplast eines der Endstationen für sekretorische Proteine von *Plasmodium* ist, wurde der Effekt der verlängerten Signalsequenz von GBP 130 auch auf den Transport eines Apikoplastproteins (ACP) untersucht. Mit diesen Experimenten sollte getestet werden, ob Apikoplastproteine an der gleichen Stelle in den sekretorischen Weg eintreten, wie die PEXEL Proteine. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Signalsequenz von GBP 130 mit und ohne die N-terminale Verlängerung (die ersten 47 AS) den Transport von ACP antreiben kann und somit dass beide Proteinarten den gleichen initialen Weg durch den sekretorischen Weg durchlaufen. Mit diesen Experimenten konnte zudem zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Signalsequenz eines Apikoplastproteins durch eine extrem verlängerten Signalsequenz ersetzt werden kann, ohne dabei die intrazelluläre Lokalisierung des Proteins zu beeinflussen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte getestet werden, ob *Plasmodium* Signalsequenzen von Humanzellen erkannt werden können. Die Ergebnisse zeigen, dass die Signalsequenz von GBP 130 vom sekretorischen Weg der Humanzellen erkannt wird sowohl mit den ersten 47 AS als auch ohne sie. Auch die kanonische Signalsequenz von Exp-1 wurde vom sekretorischen Weg der Humanzellen erkannt. Alle drei Signalsequenzen zeigen eine Lokalisierung in der Nähe des Golgi Apparates der Humanzellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass keine spezifische ER-Erkennungssignal für *Plasmodium* gibt, zumindest bei GBP 130 und Exp-1.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass *Plasmodium* Proteine mit kanonischen und verlängerten Signalsequenzen vom sekretorischen Weg der Humanzellen erkannt werden. Diese Ergebnisse zeigen aber nicht wie weit die *Plasmodium* Proteine den sekretorischen Weg der Humanzellen tatsächlich durchlaufen. Um dies zu

überprüfen, muss ein Sekretions Assay durchgeführt werden, in dem die Menge an Fusionsprotein im umgebenden Medium gemessen wird. Darüber hinaus kann man nicht ausschließen, dass die *Plasmodium* Signalsequenzen als Membranproteine in Golgi der Humanzellen verankert werden. Es wurde schon gezeigt, dass PEXEL Proteine mit einer Mutation in der PEXEL Sequenz nicht mehr von der Signalpeptidase abgespaltet werden und als Membranprotein im ER beibehalten werden (Boddey et al., 2010; Boddey et al., 2009). Die hier benutzte *Plasmodium* Signalsequenzen enthalten kein PEXEL Motiv. Möglicherweise könnten diese Signalsequenzen einfach nicht rechtzeitig von der Signalpeptidase der Humanzellen abgespaltet werden und wurden stattdessen als Ankersignal erkannt. Einst im Golgi der Humanzellen könnten vielleicht die *Plasmodium* Signalsequenzen nicht weiter verarbeitet werden, da es an *Plasmodium* spezifische Komponenten im Golgi der Humanzellen fehlt. Das Golgi Apparat von *Plasmodium* unterscheidet sich von dem der Säugertieren nicht nur in Morphologie (Bannister et al., 2003; Elmendorf and Haldar, 1993; Van Wye et al., 1996), sondern weist auch Unterschiede auf molekularer Ebene auf (Struck et al., 2008a). Um die mögliche Membrantopologie der Signalsequenzen zu verifizieren, sollte eine stabile Zelllinie erstellt werden und die eine Membranextraktion gemacht werden um zu sehen, ob die Signalsequenzen membrangebunden sind. Die stabile Zelllinie konnte aus Zeitmangel leider nicht erstellt werden.

Außerdem kann man in den IFAs nicht sichergestellt werden, ob die Fluoreszenzsignal der *Plasmodium* Signalsequenzen doch außerhalb des sekretorischen Weg der Humanzellen sich befindet. Dies kann wiederum mit einer stabilen Zelllinie analysiert werden.

5.1 Aussicht

Die Frage nach dem Warum GBP 130 eine so lange N-terminale Verlängerung hat oder warum *Plasmodium* so viele Proteine mit einer verlängerten Signalsequenz hat, bleibt ein Rätsel. Trotz seiner unbekannten Funktion eignet sich GBP 130 als Modellprotein für die Sekretion von Proteinen (Foley and Tilley, 1998; Gehde et al., 2009; Marti et al., 2004). Die Proteine RESA (ring infected erythrocyte surface antigen) und MESA (mature parasite infected surface antigen) haben zwar eine nicht so lange N-terminale Verlängerung (> 40 AS bei RESA und > 30 AS bei MESA) als GBP 130 aber ihre Funktionen sind bekannt. Man könnte ähnliche Versuche wie unsere mit diesen Proteinen durchführen um den möglichen Effekt beider N-terminalen Verlängerung auf die Proteinfunktion phänotypisch zu

untersuchen. Leider sind die meisten Proteine in unserer Vorhersage für exportierte Proteine in *Plasmodium* (Abb. 5) noch nicht charakterisiert worden, was die Anzahl an anderen möglichen Kandidaten mit einer N-terminalen Verlängerung beschränkt.

Ein Beispiel für solche Kandidaten ist PFB0106c. Dieses Protein enthält eine N-terminale Verlängerung von ca. 53 AS. PFB0106c Knockout Zelllinien zeigen keine oder eine niedrige Expression von PfEMP1 an der Oberfläche des Erythrozyts, was darauf hindeutet, dass dieses Protein für den korrekten Transport von PfEMP1 in die MC verantwortlich ist (Maier et al., 2008). Man könnte diese Knockout Zelllinie mit PFB0106c ohne die N-terminale Verlängerung transfizieren, um zu testen, ob das Wildtyp Phänotyp sich wiederherstellen lässt. Das würde einen Hinweis auf die Rolle der N-terminalen Verlängerung auf die Proteinfunktion geben. Wenn das der Fall wäre, könnte man die N-terminale Verlängerung dieses Protein durch eine Andere ersetzen, um zu testen, ob diesen möglichen Effekt Protein spezifisch ist oder nicht. Wir hatten ein ähnliches Experiment geplant. Im Laufe dieser Arbeit war es geplant, die N-terminale Verlängerung von PFB0106c durch die von GBP 130 zu ersetzen und in die Knockout Zelllinie zu transfizieren. Dieses Vorhaben ist leider aus technischen Gründen gescheitert.

Obwohl die N-terminale Verlängerung von GBP 130 keinen Einfluss auf den Proteinsortierung in *P. falciparum* hat, kann man nicht andere mögliche Funktionen ausschließen. In dem schon obengenannten Beispiel des Prion Proteins (PrP) der Säugetiere, blockiert sein langes Signalpeptid unter Stressbedingungen die ER-Insertion des Proteins (Kang et al., 2006). Dadurch wird eine Ansammlung von ungefalteten oder nicht richtig gefalteten Prion Proteinen im ER vermieden. Auch der Malaria Parasit durchlebt starke Veränderungen in seiner Umgebung. Die heftigsten Veränderungen finden während der Fieberperioden im menschlichen Wirt statt. Diese Stresssituationen sind ein Teil des Lebenszyklus des Parasiten und der verlängerte Signalpeptid von GBP 130 könnte eine ähnliche Funktion als zusätzliche Kontrollstelle für unkorrekt gefalteten Proteinen fungieren während der Fieberperioden.

Denkbar wäre auch, dass verlängerte Signalsequenzen bei *Plasmodium* eine Rolle bei der Signaltransduktion spielen könnten, wie im Fall des Signalpeptids von HIV-1 Glykoprotein 160 und wie im Fall der Signalsequenz des Milchdrüsen Tumor Virus Rem Protein der Maus (siehe Abschnitt 1.5.2 und 2).

Nach den hier präsentierten Ergebnissen sollten sich zukünftigen Projekten auf die mögliche Funktion des abgespalteten Signalpeptids von GBP 130 konzentrieren. Dabei sollte man die genaue Art der Abspaltung der Signalsequenz, die Dauer des Verbleibens im ER des daraus entstandenen Signalpeptids und sein Schicksal innerhalb der Zelle untersuchen.

In dieser Stelle ist es wichtig zu betonen, dass diese Experimente unter normalen Bedingungen keinen Einfluss der N-terminalen Verlängerung von GBP 130 auf die Proteinsortierung gezeigt haben. Es ist auch notwendig zu testen, ob unter Stressbedingungen die N-terminale Verlängerung von GBP 130 doch eine Funktion in der Proteinsortierung hat. Die Funktion der N-terminalen Verlängerung von GBP 130 muss weiter untersucht werden.

6. Literaturverzeichnis

- Aikawa, M., 1971, Parasitological review. Plasmodium: the fine structure of malarial parasites: *Exp Parasitol*, v. 30, p. 284-320.
- Amino, R., R. Ménard, and F. Frischknecht, 2005, In vivo imaging of malaria parasites--recent advances and future directions: *Curr Opin Microbiol*, v. 8, p. 407-14.
- Ansorge, I., J. Benting, S. Bhakdi, and K. Lingelbach, 1996, Protein sorting in Plasmodium falciparum-infected red blood cells permeabilized with the pore-forming protein streptolysin O: *Biochem J*, v. 315 (Pt 1), p. 307-14.
- Aurrecoechea, C., J. Brestelli, B. P. Brunk, J. Dommer, S. Fischer, B. Gajria, X. Gao, A. Gingle, G. Grant, O. S. Harb, M. Heiges, F. Innamorato, J. Iodice, J. C. Kissinger, E. Kraemer, W. Li, J. A. Miller, V. Nayak, C. Pennington, D. F. Pinney, D. S. Roos, C. Ross, C. J. Stoeckert, C. Treatman, and H. Wang, 2009, PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites: *Nucleic Acids Res*, v. 37, p. D539-43.
- Bachem, M. G., U. Riess, and A. M. Gressner, 1989, Liver fat storing cell proliferation is stimulated by epidermal growth factor/transforming growth factor alpha and inhibited by transforming growth factor beta: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 162, p. 708-14.
- Bannister, L. H., J. M. Hopkins, A. R. Dluzewski, G. Margos, I. T. Williams, M. J. Blackman, C. H. Kocken, A. W. Thomas, and G. H. Mitchell, 2003, Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 (PfAMA-1) is translocated within micronemes along subpellicular microtubules during merozoite development: *J Cell Sci*, v. 116, p. 3825-34.
- Bannister, L. H., J. M. Hopkins, R. E. Fowler, S. Krishna, and G. H. Mitchell, 2000, A brief illustrated guide to the ultrastructure of Plasmodium falciparum asexual blood stages: *Parasitol Today*, v. 16, p. 427-33.
- Baruch, D. I., B. L. Pasloske, H. B. Singh, X. Bi, X. C. Ma, M. Feldman, T. F. Taraschi, and R. J. Howard, 1995, Cloning the P. falciparum gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes: *Cell*, v. 82, p. 77-87.
- Bendtsen, J. D., H. Nielsen, G. von Heijne, and S. Brunak, 2004, Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0: *J Mol Biol*, v. 340, p. 783-95.
- Blisnick, T., M. E. Morales Betoulle, J. C. Barale, P. Uzureau, L. Berry, S. Desroses, H. Fujioka, D. Mattei, and C. Braun Breton, 2000, Pfsbp1, a Maurer's cleft Plasmodium falciparum protein, is associated with the erythrocyte skeleton: *Mol Biochem Parasitol*, v. 111, p. 107-21.
- Blobel, G., and B. Dobberstein, 1975, Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma: *J Cell Biol*, v. 67, p. 835-51.
- Boddey, J. A., A. N. Hodder, S. Günther, P. R. Gilson, H. Patsiouras, E. A. Kapp, J. A. Pearce, T. F. de Koning-Ward, R. J. Simpson, B. S. Crabb, and A. F. Cowman, 2010, An aspartyl protease directs malaria effector proteins to the host cell: *Nature*, v. 463, p. 627-31.
- Boddey, J. A., R. L. Moritz, R. J. Simpson, and A. F. Cowman, 2009, Role of the Plasmodium export element in trafficking parasite proteins to the infected erythrocyte: *Traffic*, v. 10, p. 285-99.
- Bonnefoy, S., and O. Mercereau-Puijalon, 1989, Plasmodium falciparum: an intervening sequence in the GBP 130/96 tR gene: *Exp Parasitol*, v. 69, p. 37-43.
- Borrego, F., M. Ulbrecht, E. H. Weiss, J. E. Coligan, and A. G. Brooks, 1998, Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I

- signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis: *J Exp Med*, v. 187, p. 813-8.
- Braud, V., E. Y. Jones, and A. McMichael, 1997, The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9: *Eur J Immunol*, v. 27, p. 1164-9.
- Braud, V. M., D. S. Allan, C. A. O'Callaghan, K. Söderström, A. D'Andrea, G. S. Ogg, S. Lazetic, N. T. Young, J. I. Bell, J. H. Phillips, L. L. Lanier, and A. J. McMichael, 1998, HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C: *Nature*, v. 391, p. 795-9.
- Bullen, H. E., B. S. Crabb, and P. R. Gilson, 2012, Recent insights into the export of PEXEL/HTS-motif containing proteins in *Plasmodium* parasites: *Curr Opin Microbiol*.
- Cesbron-Delauw, M. F., C. Gendrin, L. Travier, P. Ruffiot, and C. Mercier, 2008, Apicomplexa in mammalian cells: trafficking to the parasitophorous vacuole: *Traffic*, v. 9, p. 657-64.
- Chang, H. H., A. M. Falick, P. M. Carlton, J. W. Sedat, J. L. DeRisi, and M. A. Marletta, 2008, N-terminal processing of proteins exported by malaria parasites: *Mol Biochem Parasitol*, v. 160, p. 107-15.
- Connolly, T., and R. Gilmore, 1986, Formation of a functional ribosome-membrane junction during translocation requires the participation of a GTP-binding protein: *J Cell Biol*, v. 103, p. 2253-61.
- Connolly, T., and R. Gilmore, 1989, The signal recognition particle receptor mediates the GTP-dependent displacement of SRP from the signal sequence of the nascent polypeptide: *Cell*, v. 57, p. 599-610.
- Connolly, T., P. Rapiejko, and R. Gilmore, 1991, Requirement of GTP hydrolysis for dissociation of the signal recognition particle from its receptor: *Science*, v. 252, p. 1171-3.
- Cooke, B. M., D. W. Buckingham, F. K. Glenister, K. M. Fernandez, L. H. Bannister, M. Marti, N. Mohandas, and R. L. Coppel, 2006, A Maurer's cleft-associated protein is essential for expression of the major malaria virulence antigen on the surface of infected red blood cells: *J Cell Biol*, v. 172, p. 899-908.
- Cowman, A. F., and B. S. Crabb, 2006, Invasion of red blood cells by malaria parasites: *Cell*, v. 124, p. 755-66.
- Cox-Singh, J., T. M. Davis, K. S. Lee, S. S. Shamsul, A. Matusop, S. Ratnam, H. A. Rahman, D. J. Conway, and B. Singh, 2008, *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening: *Clin Infect Dis*, v. 46, p. 165-71.
- Cox-Singh, J., and B. Singh, 2008, *Knowlesi* malaria: newly emergent and of public health importance?: *Trends Parasitol*, v. 24, p. 406-10.
- Crabb, B. S., B. M. Cooke, J. C. Reeder, R. F. Waller, S. R. Caruana, K. M. Davern, M. E. Wickham, G. V. Brown, R. L. Coppel, and A. F. Cowman, 1997, Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress: *Cell*, v. 89, p. 287-96.
- Cyrklaff, M., C. P. Sanchez, N. Kilian, C. Bisseye, J. Simporé, F. Frischknecht, and M. Lanzer, 2011, Hemoglobins S and C interfere with actin remodeling in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: *Science*, v. 334, p. 1283-6.
- de Castro, F. A., G. E. Ward, R. Jambou, G. Attal, V. Mayau, G. Jaureguiberry, C. Braun-Breton, D. Chakrabarti, and G. Langsley, 1996, Identification of a family of Rab G-proteins in *Plasmodium falciparum* and a detailed characterisation of pfrab6: *Mol Biochem Parasitol*, v. 80, p. 77-88.
- de Gier, J. W., and J. Luirink, 2003, The ribosome and YidC. New insights into the biogenesis of *Escherichia coli* inner membrane proteins: *EMBO Rep*, v. 4, p. 939-43.

- de Gier, J. W., P. A. Scotti, A. Sääf, Q. A. Valent, A. Kuhn, J. Luirink, and G. von Heijne, 1998, Differential use of the signal recognition particle translocase targeting pathway for inner membrane protein assembly in *Escherichia coli*: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, p. 14646-51.
- de Koning-Ward, T. F., P. R. Gilson, J. A. Boddey, M. Rug, B. J. Smith, A. T. Papenfuss, P. R. Sanders, R. J. Lundie, A. G. Maier, A. F. Cowman, and B. S. Crabb, 2009, A newly discovered protein export machine in malaria parasites: *Nature*, v. 459, p. 945-9.
- de Rojas, M. O., and M. Wasserman, 1985, Temporal relationships on macromolecular synthesis during the asexual cell cycle of *Plasmodium falciparum*: *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 79, p. 792-6.
- Doms, R. W., G. Russ, and J. W. Yewdell, 1989, Brefeldin A redistributes resident and itinerant Golgi proteins to the endoplasmic reticulum: *J Cell Biol*, v. 109, p. 61-72.
- Dultz, E., M. Hildenbeutel, B. Martoglio, J. Hochman, B. Dobberstein, and K. Kapp, 2008, The signal peptide of the mouse mammary tumor virus Rem protein is released from the endoplasmic reticulum membrane and accumulates in nucleoli: *J Biol Chem*, v. 283, p. 9966-76.
- Eichler, R., O. Lenz, T. Strecker, M. Eickmann, H. D. Klenk, and W. Garten, 2004, Lassa virus glycoprotein signal peptide displays a novel topology with an extended endoplasmic reticulum luminal region: *J Biol Chem*, v. 279, p. 12293-9.
- Elmendorf, H. G., and K. Halder, 1993, Identification and localization of ERD2 in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: separation from sites of sphingomyelin synthesis and implications for organization of the Golgi: *EMBO J*, v. 12, p. 4763-73.
- Fidock, D. A., T. Nomura, and T. E. Wellems, 1998, Cycloguanil and its parent compound proguanil demonstrate distinct activities against *Plasmodium falciparum* malaria parasites transformed with human dihydrofolate reductase: *Mol Pharmacol*, v. 54, p. 1140-7.
- Foley, M., and L. Tilley, 1998, Protein trafficking in malaria-infected erythrocytes: *Int J Parasitol*, v. 28, p. 1671-80.
- Frevert, U., 2004, Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages: *Trends Parasitol*, v. 20, p. 417-24.
- Gehde, N., C. Hinrichs, I. Montilla, S. Charpian, K. Lingelbach, and J. M. Przyborski, 2009, Protein unfolding is an essential requirement for transport across the parasitophorous vacuolar membrane of *Plasmodium falciparum*: *Mol Microbiol*, v. 71, p. 613-28.
- Gierasch, L. M., 1989, Signal sequences: *Biochemistry*, v. 28, p. 923-30.
- Gilmore, R., and G. Blobel, 1983, Transient involvement of signal recognition particle and its receptor in the microsomal membrane prior to protein translocation: *Cell*, v. 35, p. 677-85.
- Gilmore, R., and G. Blobel, 1985, Translocation of secretory proteins across the microsomal membrane occurs through an environment accessible to aqueous perturbants: *Cell*, v. 42, p. 497-505.
- Gilmore, R., P. Walter, and G. Blobel, 1982, Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor: *J Cell Biol*, v. 95, p. 470-7.
- Grüning, C., A. Heiber, F. Kruse, J. Ungefähr, T. W. Gilberger, and T. Spielmann, 2011, Development and host cell modifications of *Plasmodium falciparum* blood stages in four dimensions: *Nat Commun*, v. 2, p. 165.
- Görlich, D., E. Hartmann, S. Prehn, and T. A. Rapoport, 1992a, A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation: *Nature*, v. 357, p. 47-52.
- Görlich, D., S. Prehn, E. Hartmann, K. U. Kalies, and T. A. Rapoport, 1992b, A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation: *Cell*, v. 71, p. 489-503.

- Günther, K., M. Tümmler, H. H. Arnold, R. Ridley, M. Goman, J. G. Scaife, and K. Lingelbach, 1991, An exported protein of *Plasmodium falciparum* is synthesized as an integral membrane protein: *Mol Biochem Parasitol*, v. 46, p. 149-57.
- Haase, S., S. Herrmann, C. Grüning, A. Heiber, P. W. Jansen, C. Langer, M. Treeck, A. Cabrera, C. Bruns, N. S. Struck, M. Kono, K. Engelberg, U. Ruch, H. G. Stunnenberg, T. W. Gilberger, and T. Spielmann, 2009, Sequence requirements for the export of the *Plasmodium falciparum* Maurer's clefts protein REX2: *Mol Microbiol*, v. 71, p. 1003-17.
- Haldar, K., 1998, Intracellular trafficking in *Plasmodium*-infected erythrocytes: *Curr Opin Microbiol*, v. 1, p. 466-71.
- Haldar, K., and N. Mohandas, 2007, Erythrocyte remodeling by malaria parasites: *Curr Opin Hematol*, v. 14, p. 203-9.
- Hiller, N. L., S. Bhattacharjee, C. van Ooij, K. Liolios, T. Harrison, C. Lopez-Estraño, and K. Haldar, 2004, A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection: *Science*, v. 306, p. 1934-7.
- Howard, R. F., and C. M. Schmidt, 1995, The secretory pathway of *plasmodium falciparum* regulates transport of p82/RAP1 to the rhoptries: *Mol Biochem Parasitol*, v. 74, p. 43-54.
- James, P., T. Vorherr, and E. Carafoli, 1995, Calmodulin-binding domains: just two faced or multi-faceted?: *Trends Biochem Sci*, v. 20, p. 38-42.
- Jungnickel, B., and T. A. Rapoport, 1995, A posttargeting signal sequence recognition event in the endoplasmic reticulum membrane: *Cell*, v. 82, p. 261-70.
- Kaiser, C. A., D. Preuss, P. Grisafi, and D. Botstein, 1987, Many random sequences functionally replace the secretion signal sequence of yeast invertase: *Science*, v. 235, p. 312-7.
- Kang, S. W., N. S. Rane, S. J. Kim, J. L. Garrison, J. Taunton, and R. S. Hegde, 2006, Substrate-specific translocational attenuation during ER stress defines a pre-emptive quality control pathway: *Cell*, v. 127, p. 999-1013.
- Kats, L. M., B. M. Cooke, R. L. Coppel, and C. G. Black, 2008, Protein trafficking to apical organelles of malaria parasites - building an invasion machine: *Traffic*, v. 9, p. 176-86.
- Klausner, R. D., J. G. Donaldson, and J. Lippincott-Schwartz, 1992, Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure: *J Cell Biol*, v. 116, p. 1071-80.
- Kochan, J., M. Perkins, and J. V. Ravetch, 1986, A tandemly repeated sequence determines the binding domain for an erythrocyte receptor binding protein of *P. falciparum*: *Cell*, v. 44, p. 689-96.
- Krieg, U. C., A. E. Johnson, and P. Walter, 1989, Protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane: identification by photocross-linking of a 39-kD integral membrane glycoprotein as part of a putative translocation tunnel: *J Cell Biol*, v. 109, p. 2033-43.
- Kurys, G., Y. Tagaya, R. Bamford, J. A. Hanover, and T. A. Waldmann, 2000, The long signal peptide isoform and its alternative processing direct the intracellular trafficking of interleukin-15: *J Biol Chem*, v. 275, p. 30653-9.
- Kyte, J., and R. F. Doolittle, 1982, A simple method for displaying the hydropathic character of a protein: *J Mol Biol*, v. 157, p. 105-32.
- Lambros, C., and J. P. Vanderberg, 1979, Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture: *J Parasitol*, v. 65, p. 418-20.
- Langreth, S. G., J. B. Jensen, R. T. Reese, and W. Trager, 1978, Fine structure of human malaria in vitro: *J Protozool*, v. 25, p. 443-52.

- Lauer, S., J. VanWye, T. Harrison, H. McManus, B. U. Samuel, N. L. Hiller, N. Mohandas, and K. Halder, 2000, Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection: *EMBO J*, v. 19, p. 3556-64.
- Lauer, S. A., P. K. Rathod, N. Ghori, and K. Halder, 1997, A membrane network for nutrient import in red cells infected with the malaria parasite: *Science*, v. 276, p. 1122-5.
- Lee, H. C., and H. D. Bernstein, 2001, The targeting pathway of *Escherichia coli* presecretory and integral membrane proteins is specified by the hydrophobicity of the targeting signal: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, p. 3471-6.
- Lee, H. C., and H. D. Bernstein, 2002, Trigger factor retards protein export in *Escherichia coli*: *J Biol Chem*, v. 277, p. 43527-35.
- Li, Y., J. J. Bergeron, L. Luo, W. J. Ou, D. Y. Thomas, and C. Y. Kang, 1996, Effects of inefficient cleavage of the signal sequence of HIV-1 gp 120 on its association with calnexin, folding, and intracellular transport: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, p. 9606-11.
- Lingelbach, K., 1997, Protein trafficking in the *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte--from models to mechanisms: *Ann Trop Med Parasitol*, v. 91, p. 543-9.
- Lingelbach, K., and K. A. Joiner, 1998, The parasitophorous vacuole membrane surrounding *Plasmodium* and *Toxoplasma*: an unusual compartment in infected cells: *J Cell Sci*, v. 111 (Pt 11), p. 1467-75.
- Lingelbach, K., and J. M. Przyborski, 2006, The long and winding road: protein trafficking mechanisms in the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte: *Mol Biochem Parasitol*, v. 147, p. 1-8.
- Maier, A. G., M. Rug, M. T. O'Neill, J. G. Beeson, M. Marti, J. Reeder, and A. F. Cowman, 2007, Skeleton-binding protein 1 functions at the parasitophorous vacuole membrane to traffic PfEMP1 to the *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte surface: *Blood*, v. 109, p. 1289-97.
- Maier, A. G., M. Rug, M. T. O'Neill, M. Brown, S. Chakravorty, T. Szeszak, J. Chesson, Y. Wu, K. Hughes, R. L. Coppel, C. Newbold, J. G. Beeson, A. Craig, B. S. Crabb, and A. F. Cowman, 2008, Exported proteins required for virulence and rigidity of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes: *Cell*, v. 134, p. 48-61.
- Marti, M., R. T. Good, M. Rug, E. Knuepfer, and A. F. Cowman, 2004, Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte: *Science*, v. 306, p. 1930-3.
- Martoglio, B., and B. Dobberstein, 1998, Signal sequences: more than just greasy peptides: *Trends Cell Biol*, v. 8, p. 410-5.
- Martoglio, B., R. Graf, and B. Dobberstein, 1997, Signal peptide fragments of preprolactin and HIV-1 p-gp160 interact with calmodulin: *EMBO J*, v. 16, p. 6636-45.
- McFadden, G. I., M. E. Reith, J. Munholland, and N. Lang-Unnasch, 1996, Plastid in human parasites: *Nature*, v. 381, p. 482.
- Meyer, D. I., E. Krause, and B. Dobberstein, 1982, Secretory protein translocation across membranes-the role of the "docking protein": *Nature*, v. 297, p. 647-50.
- Miller, L. H., D. I. Baruch, K. Marsh, and O. K. Doumbo, 2002, The pathogenic basis of malaria: *Nature*, v. 415, p. 673-9.
- Müller, M., I. Ibrahimi, C. N. Chang, P. Walter, and G. Blobel, 1982, A bacterial secretory protein requires signal recognition particle for translocation across mammalian endoplasmic reticulum: *J Biol Chem*, v. 257, p. 11860-3.
- Ng, D. T., J. D. Brown, and P. Walter, 1996, Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane: *J Cell Biol*, v. 134, p. 269-78.
- Pasvol, G., R. J. Wilson, M. E. Smalley, and J. Brown, 1978, Separation of viable schizont-infected red cells of *Plasmodium falciparum* from human blood: *Ann Trop Med Parasitol*, v. 72, p. 87-8.

- Perkins, M., 1988, Stage-dependent processing and localization of a *Plasmodium falciparum* protein of 130,000 molecular weight: *Exp Parasitol*, v. 65, p. 61-8.
- Perkins, M. E., 1984, Binding of glycoporphins to *Plasmodium falciparum* merozoites: *Mol Biochem Parasitol*, v. 10, p. 67-78.
- Perlman, D., and H. O. Halvorson, 1983, A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides: *J Mol Biol*, v. 167, p. 391-409.
- Plath, K., W. Mothes, B. M. Wilkinson, C. J. Stirling, and T. A. Rapoport, 1998, Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane: *Cell*, v. 94, p. 795-807.
- Plattner, F., and D. Soldati-Favre, 2008, Hijacking of host cellular functions by the Apicomplexa: *Annu Rev Microbiol*, v. 62, p. 471-87.
- Pologe, L. G., and J. V. Ravetch, 1986, A chromosomal rearrangement in a *P. falciparum* histidine-rich protein gene is associated with the knobless phenotype: *Nature*, v. 322, p. 474-7.
- Przyborski, J. M., S. K. Miller, J. M. Pfahler, P. P. Henrich, P. Rohrbach, B. S. Crabb, and M. Lanzer, 2005, Trafficking of STEVOR to the Maurer's clefts in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: *EMBO J*, v. 24, p. 2306-17.
- Ragge, K., H. H. Arnold, M. Tümmeler, B. Knapp, E. Hundt, and K. Lingelbach, 1990, In vitro biosynthesis and membrane translocation of the serine rich protein of *Plasmodium falciparum*: *Mol Biochem Parasitol*, v. 42, p. 93-100.
- Ravetch, J. V., J. Kochan, and M. Perkins, 1985, Isolation of the gene for a glycoporphin-binding protein implicated in erythrocyte invasion by a malaria parasite: *Science*, v. 227, p. 1593-7.
- Robinson, C., P. J. Hynds, D. Robinson, and A. Mant, 1998, Multiple pathways for the targeting of thylakoid proteins in chloroplasts: *Plant Mol Biol*, v. 38, p. 209-21.
- Rossner, M., and K. M. Yamada, 2004, What's in a picture? The temptation of image manipulation: *J Cell Biol*, v. 166, p. 11-5.
- Rug, M., S. W. Prescott, K. M. Fernandez, B. M. Cooke, and A. F. Cowman, 2006, The role of KAHRP domains in knob formation and cytoadherence of *P. falciparum*-infected human erythrocytes: *Blood*, v. 108, p. 370-8.
- Russo, I., S. Babbitt, V. Muralidharan, T. Butler, A. Oksman, and D. E. Goldberg, 2010, Plasmepsin V licenses *Plasmodium* proteins for export into the host erythrocyte: *Nature*, v. 463, p. 632-6.
- Sargeant, T. J., M. Marti, E. Caler, J. M. Carlton, K. Simpson, T. P. Speed, and A. F. Cowman, 2006, Lineage-specific expansion of proteins exported to erythrocytes in malaria parasites: *Genome Biol*, v. 7, p. R12.
- Sato, S., and R. J. Wilson, 2004, The use of DsRED in single- and dual-color fluorescence labeling of mitochondrial and plastid organelles in *Plasmodium falciparum*: *Mol Biochem Parasitol*, v. 134, p. 175-9.
- Schatz, P. J., and J. Beckwith, 1990, Genetic analysis of protein export in *Escherichia coli*: *Annu Rev Genet*, v. 24, p. 215-48.
- Sidjanski, S., and J. P. Vanderberg, 1997, Delayed migration of *Plasmodium* sporozoites from the mosquito bite site to the blood: *Am J Trop Med Hyg*, v. 57, p. 426-9.
- Smith, J. D., C. E. Chitnis, A. G. Craig, D. J. Roberts, D. E. Hudson-Taylor, D. S. Peterson, R. Pinches, C. I. Newbold, and L. H. Miller, 1995, Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes: *Cell*, v. 82, p. 101-10.
- Spielmann, T., and T. W. Gilberger, 2010, Protein export in malaria parasites: do multiple export motifs add up to multiple export pathways?: *Trends Parasitol*, v. 26, p. 6-10.

- Spycher, C., M. Rug, N. Klonis, D. J. Ferguson, A. F. Cowman, H. P. Beck, and L. Tilley, 2006, Genesis of and trafficking to the Maurer's clefts of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: *Mol Cell Biol*, v. 26, p. 4074-85.
- Struck, N. S., S. de Souza Dias, C. Langer, M. Marti, J. A. Pearce, A. F. Cowman, and T. W. Gilberger, 2005, Re-defining the Golgi complex in *Plasmodium falciparum* using the novel Golgi marker PfGRASP: *J Cell Sci*, v. 118, p. 5603-13.
- Struck, N. S., S. Herrmann, C. Langer, A. Krueger, B. J. Foth, K. Engelberg, A. L. Cabrera, S. Haase, M. Treeck, M. Marti, A. F. Cowman, T. Spielmann, and T. W. Gilberger, 2008a, *Plasmodium falciparum* possesses two GRASP proteins that are differentially targeted to the Golgi complex via a higher- and lower-eukaryote-like mechanism: *J Cell Sci*, v. 121, p. 2123-9.
- Struck, N. S., S. Herrmann, I. Schmuck-Barkmann, S. de Souza Dias, S. Haase, A. L. Cabrera, M. Treeck, C. Bruns, C. Langer, A. F. Cowman, M. Marti, T. Spielmann, and T. W. Gilberger, 2008b, Spatial dissection of the cis- and trans-Golgi compartments in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: *Mol Microbiol*, v. 67, p. 1320-30.
- Stuart, R. A., and W. Neupert, 1996, Topogenesis of inner membrane proteins of mitochondria: *Trends Biochem Sci*, v. 21, p. 261-7.
- Sturm, A., R. Amino, C. van de Sand, T. Regen, S. Retzlaff, A. Rennenberg, A. Krueger, J. M. Pollok, R. Menard, and V. T. Heussler, 2006, Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids: *Science*, v. 313, p. 1287-90.
- Su, X. Z., V. M. Heatwole, S. P. Wertheimer, F. Guinet, J. A. Herrfeldt, D. S. Peterson, J. A. Ravetch, and T. E. Wellems, 1995, The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: *Cell*, v. 82, p. 89-100.
- Talmadge, K., S. Stahl, and W. Gilbert, 1980, Eukaryotic signal sequence transports insulin antigen in *Escherichia coli*: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 77, p. 3369-73.
- Tonkin, C. J., J. A. Pearce, G. I. McFadden, and A. F. Cowman, 2006, Protein targeting to destinations of the secretory pathway in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: *Curr Opin Microbiol*, v. 9, p. 381-7.
- Trager, W., and J. B. Jensen, 1976, Human malaria parasites in continuous culture: *Science*, v. 193, p. 673-5.
- Van Wye, J., N. Ghori, P. Webster, R. R. Mitschler, H. G. Elmendorf, and K. Haldar, 1996, Identification and localization of rab6, separation of rab6 from ERD2 and implications for an 'unstacked' Golgi, in *Plasmodium falciparum*: *Mol Biochem Parasitol*, v. 83, p. 107-20.
- Vincensini, L., S. Richert, T. Blisnick, A. Van Dorsselaer, E. Leize-Wagner, T. Rabilloud, and C. Braun Breton, 2005, Proteomic analysis identifies novel proteins of the Maurer's clefts, a secretory compartment delivering *Plasmodium falciparum* proteins to the surface of its host cell: *Mol Cell Proteomics*, v. 4, p. 582-93.
- von Heijne, G., 1983, Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites: *Eur J Biochem*, v. 133, p. 17-21.
- von Heijne, G., 1984, Analysis of the distribution of charged residues in the N-terminal region of signal sequences: implications for protein export in prokaryotic and eukaryotic cells: *EMBO J*, v. 3, p. 2315-8.
- von Heijne, G., 1985, Signal sequences. The limits of variation: *J Mol Biol*, v. 184, p. 99-105.
- von Heijne, G., 1986, A new method for predicting signal sequence cleavage sites: *Nucleic Acids Res*, v. 14, p. 4683-90.
- Walliker, D., I. A. Quakyi, T. E. Wellems, T. F. McCutchan, A. Szarfman, W. T. London, L. M. Corcoran, T. R. Burkot, and R. Carter, 1987, Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: *Science*, v. 236, p. 1661-6.

- Walter, P., and G. Blobel, 1981, Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes: *J Cell Biol*, v. 91, p. 557-61.
- Walter, P., I. Ibrahimi, and G. Blobel, 1981, Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein: *J Cell Biol*, v. 91, p. 545-50.
- Walter, P., and A. E. Johnson, 1994, Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane: *Annu Rev Cell Biol*, v. 10, p. 87-119.
- Walter, P., and V. R. Lingappa, 1986, Mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane: *Annu Rev Cell Biol*, v. 2, p. 499-516.
- Weatherall, D. J., L. H. Miller, D. I. Baruch, K. Marsh, O. K. Doumbo, C. Casals-Pascual, and D. J. Roberts, 2002, Malaria and the red cell: *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, p. 35-57.
- Wiedmann, M., D. Goerlich, E. Hartmann, T. V. Kurzchalia, and T. A. Rapoport, 1989, Photocrosslinking demonstrates proximity of a 34 kDa membrane protein to different portions of preprolactin during translocation through the endoplasmic reticulum: *FEBS Lett*, v. 257, p. 263-8.
- Wirth, D. F., 2002, Biological revelations: *Nature*, v. 419, p. 495-6.
- World Health Organization., 2011, World malaria report 2011: Geneva, World Health Organization, xii, 246 p. p.

V Danksagung

Ich will mich ganz herzlich bei Dr. Jude Przyborski und Prof. Lingelbach für Ihre grosse Unterstützung und Bemühungen im Laufe diesen drei Jahren bedanken.

Danke auch an meinen lieben Kollegen, insbesondere an Sabrina.

Vielen Dank an meine Familie und meine Freundin, die mich immer unterstützt und motiviert haben.

VI Erklärung

ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Untersuchung der Funktion der N-terminalen Verlängerung von GBP 130 von *Plasmodium falciparum*“

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort/Datum)

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)